

Algorithmierung und automatisierte Datenauswertung für die hochauflösende und ultrahochauflösende Massenspektrometrie

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik

der Universität Rostock

vorgelegt von

Enrico Schmidt, geb. am 18.03.1978 in Rostock

aus Rostock

Rostock, den 31.03.2007

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0051-5

Erster Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow (Universität Rostock)

Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Norbert Stoll (Universität Rostock)

Dritter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Gerhard Matz (TU Hamburg-Harburg)

Disputation am: 15.11.2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Automatisierungstechnik der Universität Rostock durchgeführt und wäre ohne vielfältige Unterstützung nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Prof. Kerstin Thurow und Prof. Norbert Stoll für den großen wissenschaftlichen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas, die aufgebrachte Geduld und für eine mehr als großzügig ausgestattete Arbeitsumgebung.

Dr. Christine Fischer, Hannelore Baudisch und Dr. Dirk Gördes möchte ich für die vielen wertvollen Diskussionen und Hinweise zur Massenspektrometrie und die herzliche Atmosphäre im Labor danken.

Dieter Lilienthal, Udo Schülke und Heiko Engelhardt seien für die schnelle Hilfe und den großen Einsatz bei den vielen kleineren und größeren Reparaturen, Erweiterungen und der Wartung des FTICR-MS („Tamagotchi“) gedankt.

Allen Institutsangehörigen die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden, sei mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich Frau Marlis Schröder meinen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei all meinen Verwandten, Freunden und Bekannten bedanken, die mich in den Jahren der Erstellung der Dissertation vor allem moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die, im Rahmen des Landesforschungsschwerpunktes „Neue Wirkstoffe und Biomaterialien-Screeningverfahren & Produktentwicklung“ und des Graduiertenkollegs 1213 „Neue Methoden für Nachhaltigkeit in Katalyse und Technik“, gewährte finanzielle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
VERWENDETE GRÖßEN UND EINHEITEN.....	XIII
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	XIV
1. EINLEITUNG	1
2. EINFÜHRUNG	4
2.1. Massenspektrometrie	4
2.1.1. Ionisierungsmethoden	5
2.1.2. Massenselektive Analysatoren	15
3. METHODEN ZUR AUSWERTUNG HOCHAUFGEÖSTER UND ULTRAHOCHAUFGEÖSTER MASSENSPEKTREN	25
3.1. Summenformelbestimmung - Elementaranalyse	30
3.1.1. Kombinationsmethode	31
3.1.2. Ergänzung von Wasserstoff.....	32
3.1.3. Berechnung des Anteils von Kohlenstoff und Wasserstoff in einer EK.....	35
3.1.4. Summenformelbestimmung aus Isotopenmustern in niedrigaufgelösten Massenspektren	39
3.2. Berechnung theoretischer Isotopenmuster	40
3.2.1. Mathematische Grundlagen.....	42
3.2.2. Berechnungsmethoden.....	43
3.2.3. Betrachtungen zur Genauigkeit der Intensitätsmessung im Massenspektrometer	60
3.3. Methoden zur Reduktion der Lösungsmenge.....	61
3.3.1. Exakte Massenbestimmung.....	61
3.3.2. Ring-Doppelbindungsäquivalent - RDB-Filter.....	63
3.3.3. Verhältnis von Kohlenstoff zu Heteroatomen	65
3.3.4. Auswertung des spektralen Isotopenmusters - Isotopenmusteranalyse	66
3.4. Auswertung von Massenspektren.....	77
3.4.1. Identifizierung von Molekülionen	77
3.4.2. Mehrfachgeladene Ionen	81
3.4.3. Auswertung von Fragmenten – Fragment-Analyse	82
4. UMSETZUNG UND IMPLEMENTIERUNG	92
4.1. Generierung der Summenformeln.....	92

4.1.1. Laufzeituntersuchung	94
4.2. Isotopenmusteranalyse	95
4.2.1. Laufzeit- und Genauigkeitsvergleich der Isotopenmuster Simulationsverfahren	95
4.2.2. Automatische Auswahl des angewendeten Simulationsverfahrens	99
4.2.3. Bestimmung der Auflösung.....	101
4.3. Molekülionensuche.....	102
4.4. Fragmentauswertung.....	103
4.4.1. Konsistenzüberprüfung zwischen zwei Peaks.....	103
4.4.2. Berechnung konsistenter EK für Mutter- und Tochterpeaks	105
4.4.3. Fragmentierungspfade.....	105
4.5. Parameter und Benutzeroberflächen	108
4.5.1. Parameter und Eingabemasken bei der Summenformelbestimmung.....	108
4.5.2. Parameter und Eingabemaske der Isotopenmusteranalyse	110
4.5.3. Parameter und Eingabemaske bei der Suche nach Molekülionen.....	112
4.5.4. Parameter und Eingabemaske für die Zuweisung von Fragmenten	113
5. APPLIKATIONSBEISPIELE	115
5.1. Einfluss des Isotopenmusterfilters	115
5.2. Reserpin	117
5.3. Warfarin.....	123
5.4. Triphenylarsin	125
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	127
7. SUMMARY	130
8. ANHANG A: MATERIAL UND METHODEN	132
8.1. Software	132
8.2. Massenspektrometer	132
9. ANHANG B: DATEIFORMATE.....	133
9.1. Spezifikation des ASCII-Formates für Addukt- und Clusterionen	133
9.1.1. Zweck.....	133
9.1.2. Verzeichnis und Dateiendung.....	133
9.1.3. Syntax	133
9.1.4. Beschreibung	134
9.2. Spezifikationen des ASCII-Formates der Peaklisten.....	135
9.2.1. Zweck.....	135
9.2.2. Syntax	135
9.2.3. Beschreibung	135
9.3. Spezifikation des ASCII-Formates der PSE Datei: „periodic.tab“	135
9.3.1. Zweck.....	135
9.3.2. Verzeichnis und Dateiendung.....	135

9.3.3. Syntax	136
9.3.4. Beschreibung	136
LITERATURVERZEICHNIS	137
LEBENS LAUF	156

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers	5
Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer Elektronenstoß-Quelle	6
Abbildung 2.3: Vergrößerte Aufnahme von Elektrospray-Nadeln: Polyimid mit Gold a) und mit Graphit b) beschichtet und eine Metallbeschichtete Nanospray-Nadel c). Der Ausschnitt zeigt eine graphitbeschichtete Nadel beim Sprayvorgang [34].....	8
Abbildung 2.4: Prinzip der Elektrospray Ionisation (ESI)	9
Abbildung 2.5: Prinzip der „ <i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization</i> “ (MALDI).....	12
Abbildung 2.6: Die einwirkenden Kräfte und die resultierende Bewegung positiv und negativ geladener Teilchen in homogenen magnetischen Feldern. Die magnetischen Feldlinien stehen senkrecht auf der Zeichnungsebene.	19
Abbildung 2.7: Vereinfachte Darstellung der Anregung eines Paketes Ionen gleicher Masse und der nachfolgenden Detektion des induzierten Signals.....	20
Abbildung 2.8: Die Zyklotronbewegung a) wird in der Realität noch durch zwei weitere Bewegungen überlagert: b) Magnetronbewegung in der z-Ebene folgt aus dem Zusammenwirken von magnetischen und elektrischen Feld in der Analysatorzelle, c) Pendelbewegung der Ionen entlang der z-Achse aufgrund des Trapping-Potenzials [93, 94]. Die aus der Überlagerung der Einzelbewegungen resultierende Flugbahn eines Ions ist in der unteren Grafik dargestellt.....	21
Abbildung 2.9: Detektierter Transient (oben), fouriertransformiertes Signal (mitte) und resultierendes Massenspektrum (unten)	23
Abbildung 3.1: Definition der Massenauflösung über die Peakbreite. „ <i>Full Width at Half Maximum</i> “ FWHM-Kriterium.	27
Abbildung 3.2: Reihenfolge der eingesetzten Auswertalgorithmen	29
Abbildung 3.3: Darstellung des exponentiellen Anstiegs der Anzahl möglicher Elementarkombinationen mit steigender Masse für eine Auswahl verschiedener Elemente.....	32
Abbildung 3.4: Ablaufplan der rechnerischen Ergänzung von Kohlenstoff und Wasserstoff zu einer Kombination von Heteroatomen	38
Abbildung 3.5: Algorithmus zur Bestimmung der Isotopenkonfigurationen einer EK.....	44
Abbildung 3.6: Ablaufplan der Berechnung des theoretischen Isotopenmusters einer beliebigen EK durch Faltung von elementaren Mustern durch Verwendung der Fourier-Transformation.	55
Abbildung 3.7: Berechnung der resultierenden Masse von zwei isobaren, überlagerter Isotopenkonfigurationen als wahrscheinlichkeitsgewichtete Summe der Einzelmassen	59
Abbildung 3.8: Anzahl der Elementarkombinationen aus den Elementen C, H, N, O und S für drei Ionen mit den Massen 180,04171 Da (Glukose, M^+), 610,15284 Da (Rutin, M^+) und 1046,54179 Da (Angiotensin II, M^+) in Abhängigkeit von der Massengenauigkeit.	62
Abbildung 3.9: Beispiel für eine EK mit einem negativen RDB-Äquivalent für die keine sinnvolle strukturelle Repräsentation existieren kann.	64
Abbildung 3.10: Prinzip des Muster-Vergleichs („ <i>Pattern Matching</i> “) bei der Isotopenmuster-analyse. Links ist der Ausschnitt eines experimentellen Spektrums abgebildet, der das Isotopenmuster des Molekülions $(M+H)^+$ der Substanz Rutin zeigt. Rechts sind die simulierten Muster für zwei	

EK abgebildet, die der exakten Masse 611,16124 Da im Intervall von +/- 5 ppm aus den Elementen C, H, N, O, Cl und Br zugeordnet werden können.	67
Abbildung 3.11: Interpolation des Peakverlaufes im Bereich eines lokalen Maximums um die drei Datenpunkte (m_{i-1} , I_{i-1}), (m_i , I_i) und (m_{i+1} , I_{i+1}) durch eine Parabel. Der Punkt (m_{\max} , I_{\max}) ist der globale Extremwert der Parabel und repräsentiert die tatsächliche Position der Signalspitze. ...	68
Abbildung 3.12: FTICR-ESI Massenspektrum der Verbindung ($C_{28}H_{26}N_4O_4S_1+Na$) ⁺ bei einer Auflösung von 60000. Die Vergrößerung der (M+2)-Peaks zeigt die getrennte Darstellung der maßgeblich von Schwefel $^{34}S_1$ und von Kohlenstoff $^{13}C_2$ verursachten Isotopenpeaks. Die von Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff verursachten Anteile an den Peaks sind gering und in der Beschriftung vernachlässigt worden.	71
Abbildung 3.13: Gegenüberstellung des experimentellen (links) und des simulierten (rechts) Isotopenmusters von Rutin (M+H) ⁺ . Das instrumentelle Rauschen wurde mit einer relativen Intensität von 1% bestimmt. Die auf das simulierte Muster normierte Intensität des Rauschens beträgt 0,0073. ^{a)} Man erkennt, dass der fünfte simulierte Isotopenpeak (M+5) eine Intensität ($I_P(5)$) unter dem „Noise Level“ des Spektrums besitzt und deshalb im experimentellen Spektrum nicht nachgewiesen werden kann.	73
Abbildung 3.14: Experimentelles Isotopenmuster eines Fragmentes von Rutin mit der monoisotopischen Masse von 303,05026 Da. Die Vergrößerung zeigt zwei aufgelöste isobare Isotopenpeaks an der Position (M+2). Der rechte Isotopenpeak des Dubletts wird durch das Sauerstoff-Isotop ^{18}O der linke Peak durch zwei ^{13}C -Isotope im Ion verursacht. Die Auflösung beträgt ca. 120000.	76
Abbildung 3.15: ESI-FTICR <i>In-Source</i> -CID Massenspektrum von Rutin mit einem Fragmentierungspotenzial von 120 V. Der Einsatz oben rechts zeigt ein Spektrum, das mit einem geringeren Fragmentierungspotenzial von 80 V aufgenommen wurde.	85
Abbildung 3.16: Hypothetische Fragmentierung eines einfachen vieratomigen linearen Ions. Die Möglichkeit von Umlagerungsreaktion wird nicht berücksichtigt [223].	88
Abbildung 3.17: Mögliche Fragmentierungspfade, die zur Entstehung der Fragmente F1 und F2 führen.	90
Abbildung 3.18: FTICR-MS ² -Spektrum des isolierten Molekülions M (611 Da) und MS ³ -Spektrum des isolierten Fragmentes F1 (465 Da) von Rutin. Die Isolation erfolgte mit einem „Sweep“-Impuls. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet. Die mit einem „*“ gekennzeichneten Peaks sind Artefakte, die keinen sinnvollen Massendefekt besitzen.	91
Abbildung 3.19: Zuordnung der nachgewiesenen Fragmente F1 und F2 zu Strukturelementen von Rutin.	91
Abbildung 4.1: Programmablaufplan der kombinatorischen Generierung der EK zu einer gegebenen Masse aus einer vorgegebenen Menge an Isotopen. Die exakte Masse, das RDB-Äquivalent und das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Heteroatomen werden schon bei der Erzeugung der EK ausgewertet um den Speicherbedarf zu reduzieren.	93
Abbildung 4.2: Laufzeit (links) und relative Abweichung (rechts) der chemischen Masse von der intensitätsgewichteten Summe der Isotopenpeakmassen nach Berechnung der Isotopenmuster durch die Polynommethode für vier EK und mit drei unterschiedlichen relativen	

Intensitätsschwellen. Bei einer Intensitätsschwelle von 10^{-15} war die Simulation von Rinderinsulin nicht in einer realistischen Zeitspanne möglich.	96
Abbildung 4.3: Laufzeit (links) und relative Genauigkeit (rechts) des Isotopenmuster-Simulationsverfahrens basierend auf dem FFT-Algorithmus für die vier EK aus Tabelle 4.2 mit den Auflösungen 20000 und 100000.	97
Abbildung 4.4: Relative Abweichung der chemischen Massen von der intensitätsgewichteten Summe der Massen der simulierten Isotopenpeaks bei drei Intensitätsschwellen.	98
Abbildung 4.5: Überlagerung von zwei gleich intensiven gaußförmigen Peaks bei drei verschiedenen Abständen zueinander. Im linken Bild beträgt der Abstand $3/4$ der Peakbreite $\Delta m_{50\%}$. Man erkennt, dass die beiden einzelnen Peaks (gestrichelt) zu einem Peak verschmelzen (durchgehende Linie). Bei einem Abstand von genau $\Delta m_{50\%}$ (Mitte) sind die beiden Signalspitzen schon unterscheidbar. Vergrößert man den Abstand auf $5/4 \cdot \Delta m_{50\%}$ (rechtes Bild) treten die einzelnen Peaks deutlich hervor.	99
Abbildung 4.6: PAP der Molekülionensuche	102
Abbildung 4.7: PAP der Überprüfung der Konsistenz zwischen zwei Peaks	104
Abbildung 4.8: PAP der Bestimmung konsistenter EK für einen Peak.	105
Abbildung 4.9: Mögliche Darstellungsformen eines gerichteten Graphen. Die negativen Einträge in der Inzidenzmatrix kennzeichnen die Ausgangsknoten und die positiven Einträge den Zielknoten einer Kante e des gerichteten Graphen. In der Adjazenzmatrix und Adjazenliste sind die Richtungsinformationen implizit enthalten.	106
Abbildung 4.10: PAP der Bestimmung aller möglichen Fragmentierungspfade	108
Abbildung 4.11: Bildschirmfoto: Eingabemaske Elemente	109
Abbildung 4.12: Bildschirmfoto: Eingabemaske Filter	109
Abbildung 4.13: Bildschirmfoto: Eingabemaske Isotopenmusteranalyse	110
Abbildung 4.14: Bildschirmfoto: Molekülionensuche	113
Abbildung 4.15: Bildschirmfoto: Zuweisung von Fragmenten	114
Abbildung 5.1: Einfluss des Isotopenmusterfilters auf die Anzahl der ermittelten EK für Molekülionen von 25 Verbindungen im Bereich von 300 - 1000 Da. Die Spektren wurden mit einem FTICR-MS und Elektrospray Ionisation aufgenommen. Die Toleranz der Massenbestimmung beträgt $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm. Es wurden die 8 Elemente C, H, N, O, Ru_{0-1} , S_{0-2} , Cl_{0-2} , Br_{0-2} berücksichtigt und ein Ring-Doppelbindungsäquivalent im Bereich von $-0.5 < \text{RDB} < 1000$ vorausgesetzt. Für eine gültige EK wurde eine minimale Intensitätskorrelation von $I_{\text{cormin}} = 80\%$ erwartet. In keinem Fall wurde die richtige EK ausgeschlossen.	115
Abbildung 5.2: FTICR-ESI-Spektren von Reserpin im positiven Ionisierungsmodus. Das obere Spektrum wurde mit einem erhöhten Fragmentierungspotenzial im Quellenbereich aufgenommen (<i>In-Source</i> -CID). Die dabei entstandenen acht Fragmente (*) konnten durch ein MS^2 -Experiment, bei dem das Molekülion $(\text{M}+\text{H})^+$ von Reserpin (609 Da) in der Messzelle des MS isoliert und anschließend gezielt durch ein in den Analysatorraum eingebrachte Kollisionsgas (Argon) und darauf folgender Anregung mittels eines SORI-Impulses fragmentiert wurde, bestätigt werden.	118

Abbildung 5.3: MS ³ -Spektren der Fragmente F1, F2, F4 und F5. Die Fragmentierung erfolgte nach der Isolierung des betreffenden Ions durch SORI-CID mit Argon in der Analysatorzelle eines FTICR-MS.....	120
Abbildung 5.4: Aus den nachgewiesenen Tochterionen der Fragmente F1, F2, F4, und F5 resultierende Fragmentierungspfade. Zur Validierung wurden allen Fragmenten Strukturelemente von Reserpin zugeordnet, die mit den dargestellten Fragmentierungspfaden im Einklang stehen.	122
Abbildung 5.5: FTICR-ESI-Massenspektrum von Warfarin im positiven Ionisierungsmodus. Das obere Spektrum zeigt das ESI-CID-Spektrum, das mit einem Fragmentierungspotenzial von 130 V aufgenommen wurde. Das SORI-CID-Spektrum des isolierten Molekülions (M+H) ⁺ bei 309 Da (unten) dient der eindeutigen Zuordnung entstehender Fragmente des ESI-CID-Spektrums zum Molekülion. *Das signifikante Ion bei 149,02346 Da ist ein Fragmentierungsprodukt von Weichmachern auf Phtalatbasis in den verwendeten Probenbehältern.....	123
Abbildung 5.6: Mit den EK von Warfarin konsistente Fragmentierungspfade (links). Die fett hervorgehobenen Pfade können in Übereinstimmung mit der dargestellten Struktur (rechts) ermittelt werden.	124
Abbildung 5.7: EI-FTICR-Massenspektrum von Triphenylarsin das mit einem Ionisierungspotenzial von 70 V im positiven Modus aufgenommen wurde.....	125
Abbildung 5.8: Strukturformel von Triphenylarsin (C ₁₈ H ₁₅ As)	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Häufig verwendete UV-MALDI Matrizen und deren Anwendung	12
Tabelle 3.1: Auflösungen verschiedener Massenanalysatoren.....	28
Tabelle 3.2: Kombination für die Masse $M = 181,04954$ Da, Acetylsalicylsäure ($C_9H_8O_4 + H$) ⁺	33
Tabelle 3.3: Natürlich vorkommende Isotope der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Chlor und Brom.....	40
Tabelle 3.4: Isotopenkonfigurationen von Kohlenmonoxid (CO). Die beiden signifikanten Konfigurationen sind hervorgehoben.....	45
Tabelle 3.5: Bestimmung der Zweierpotenzen einer binären Zahl	58
Tabelle 3.6: ¹³ C-Gehalt von Kohlenstoff in Abhängigkeit von seiner Herkunft [181].....	61
Tabelle 3.7: Anzahl der EK für das experimentelle Spektrum von Rutin aus Abbildung 3.10 in Abhängigkeit von I_{corrin} . Kombinierte Elemente: C, H, N, O Cl, und Br, Filter, RDB ≥ 0 , $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm.....	70
Tabelle 3.8: Auf 100% ($I_S(i)$) und auf die simulierten Intensitäten ($I_S(i)/\alpha$) normierte experimentelle Intensitäten ($I_P(i)$) der Substanz Rutin aus Abbildung 3.10. Die simulierten Intensitäten entsprechen der EK $C_{27}H_{31}O_{16}^+$ aus Abbildung 3.10 links unten.	72
Tabelle 3.9: Resultierende EK nach einheitsaufgelöster und hochaufgelöster Simulation des Isotopenmusters und Korrelation mit hochaufgelösten experimentellen Spektrum	76
Tabelle 3.10: Häufig beobachtete Molekülionen in positiver ESI, APCI, und MALDI [195]	78
Tabelle 3.11: Häufig beobachtete Molekülionen in negativer ESI, APCI, und MALDI [195].....	79
Tabelle 3.12: Bestimmung von Molekülionen am Beispiel eines Peaks eines Spektrums von Rutin... ..	80
Tabelle 3.13: Mögliche Summenformeln für das $(M+H)^+$ Ion aus Abbildung 3.15	85
Tabelle 3.14: EK _F die den Fragmenten F1 und F2 zugeordnet werden.....	86
Tabelle 3.15: EK _M des Molekülions, EK _{F2} des Fragmentes F2 und dazugehörige EK _{NV} des Neutralverlustes. Für die ersten zwei EK _M des Molekülions existieren keine Neutralverluste zum Fragment F2.	87
Tabelle 3.16: Überprüfung der Konsistenz zwischen den Fragmenten F1 und F2, dem Molekülion von Rutin und dem Ion I2	89
Tabelle 4.1: Laufzeiten [s] verschiedener kommerzieller und „Freeware“-Programme sowie der eigenen Implementierung bei der Bestimmung der EK für die Massen 250, 500, 1000, und 2000 Da aus den fünf Elementen C, H, N, O und S.	94
Tabelle 4.2: Für die Laufzeit- und Genauigkeitsuntersuchungen verwendete EK.	96
Tabelle 4.3: Massendifferenzen Δm signifikanter Isotopenkonfigurationen organischer Verbindungen	100
Tabelle 5.1: Berechnungsergebnisse für das $(M+Na)^+$ -Ion (585 Da) von Verbindung 15 ($C_{27}H_{23}N_4S_1Br_1$). Die instrumentelle Auflösung beträgt 52000	117
Tabelle 5.2: Aus der Überprüfung der Konsistenz zwischen den betrachteten Ionen der Substanz Reserpin resultierende Adjazenzmatrix.	119
Tabelle 5.3: Übersicht über die durch MS ⁿ -Experimente nachgewiesenen Tochterionen der vier Fragmente F1, F2, F4 und F5.....	121

Tabelle 5.4: Anzahl der EK ohne (a) und mit Anwendung des Isotopenmusterfilters (b), sowie mit zusätzlicher Konsistenzüberprüfung zwischen den Fragmenten und dem Molekülion (c) und zwischen verwandten Fragmenten unter Berücksichtigung der MS ⁿ -Informationen aus Tabelle 5.3 (d). Verbleibende EK für das Molekülion und die acht betrachteten Fragmente im Fall d...	121
Tabelle 5.5: Dem Molekülion und den Fragmenten zugeordnete EK nach durchgeführtem Konsistenztest. Anzahl der EK ohne (a) und mit Anwendung des Isotopenmusterfilters (b) sowie mit zusätzlicher Konsistenzüberprüfung zwischen den Fragmenten und dem Molekülion (c)...	124
Tabelle 5.6: Anzahl der dem Molekülion und fünf Fragmenten von Triphenylarsin zugeordneten EK nach drei Auswerteschritten: a) kombinatorische Zuordnung, b) Isotopenmusterfilter, c) Konsistenzüberprüfung der Fragmente mit dem Molekülion. Adjazenzliste konsistenter Fragmentierungspfade und EK jedes Ions.	126
Tabelle 9.1: <i>Token</i> zu Deklaration von Addukt- und Clusterionen	134

Verwendete Größen und Einheiten

B [T]	magnetische Flussdichte [Tesla]
Bar	Einheit des Druckes, 1 bar = 100.000 Pa
°C	Grad Celsius, Einheit der Temperatur, 0 °C = 273,15 K
D [Da]	Massendefekt [Dalton]
dB	Dezibel, Symbol zur Kennzeichnung des dekadischen Logarithmusses des Verhältnisses zweier gleichartiger, physikalischer Größen
e	Elementarladung, $e = 1,602176462 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
E [V/m]	elektrische Feldstärke [Volt pro Meter]
E _{el} [J]	elektrische Energie [Joule], 1 J = 1 V*A*s
E _{kin} [J]	kinetische Energie [Joule], 1 J = 1 (kg*m ²)/s ²
eV	Elektronenvolt, Einheit der Energie, 1eV = 1,602 * 10 ⁻¹⁹ J
f [Hz]	Frequenz [Hertz]
F [N]	Kraft [Newton], 1 N = 1 (kg*m)/s ²
I	relative Intensität
K	Kelvin, Einheit der Temperatur, 0 K = -273,15 °C
Ki	Binärpräfix kibi, Symbol laut IEC 60027-2, 1 Ki = 2 ¹⁰ = 1024
l	Liter, Einheit des Volumens, 1 l = 1000 cm ³
m [kg]	Masse [Kilogramm]
m/z [Th]	Masse-Ladungsverhältnis [Thomson]
min	Einheit der Zeit, Minuten
n [mol]	Stoffmenge [Mol], Teilchenzahl pro mol N _A = 6,0221415 * 10 ²³ mol ⁻¹ (Avogadro-Zahl)
P	relative Auftrittswahrscheinlichkeit
P [Pa]	Druck [Pascal]
q [C]	elektrische Ladung [Coulomb], 1 C = 1 A*s
R	resolution, Auflösung
R _{FWHM}	Auflösung nach dem Peakbreiten-Kriterium
t [s]	Zeit [Sekunden]
u [Da]	<i>atomic mass unit (u, amu)</i> , atomare Masseneinheit [Dalton], 1 Da = m(¹² C ₁)/12 = 1,6605402*10 ⁻²⁷ kg

U [V]	elektrische Spannung [Volt]
v [m/s]	Geschwindigkeit [Meter pro Sekunde]
W	Watt, Einheit der Leistung
z	Ladungszahl, Anzahl der Elementarladungen e
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante, $\epsilon_0 = 8,85418781 \cdot 10^{-12}$ As/Vm
ω [s ⁻¹]	Kreisfrequenz [Radiant pro Sekunde]

Verwendete Abkürzungen

ACN	<i>acetonitril</i> , Acetonitril
AD-Wandler	Analog/Digital-Wandler
AP	<i>atmospheric pressure</i> , Atmosphärendruck
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> , chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
API	<i>atmospheric pressure ionization</i> , Ionisierung bei Atmosphärendruck
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CI	<i>chemical ionization</i> , chemische Ionisierung
CID	<i>collision induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Dissoziation
DESI	<i>desorption electrospray ionization</i> , Desorptions-Elektrospray-Ionisierung
DF	diskrete Faltung
DFT	<i>discrete Fourier-transform</i> , diskrete Fourier-Transformation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EI	<i>electron impact ionization</i> , Elektronenstoßionisierung
EK	Elementarkombination, Summenformel
ESI	<i>electrospray ionization</i> , Elektrospray-Ionisierung
FA	<i>formic acid</i> , Ameisensäure
FDI	<i>field desorption and ionization</i> , Felddesorption und Ionisierung
FFT	<i>fast Fourier transform</i> , schnelle Fourier-Transformation
FI	<i>field ionization</i> , Feldionisierung
FT	<i>Fourier transform</i> , Fourier-Transformation

FTICR-MS	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometer</i> , Fourier-Transformation Ionen-Zyklotronresonanz- Massenspektrometer
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , Peakbreite bei halber Peakhöhe, Halbwertsbreite
GC	<i>gaseous chromatography</i> , Gaschromatographie
ICR	<i>ion cyclotron resonance</i> , Ionen-Zyklotronresonanz
IFT	inverse Fourier-Transformation
IRMPD	<i>infrared multi photon dissociation</i> , Infrarot Multiphotonen Dissoziation
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LDI	<i>laser desorption and ionization</i> , Laser-Desorption und Ionisierung
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i> , Matrix unterstützte Laser-Desorption und Ionisierung
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS, MS ⁿ	<i>tandem mass spectrometry</i> , Tandem-Massenspektrometrie
NCI	<i>negative chemical ionization</i> , negative chemische Ionisierung
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NV	Neutralverlust
PAP	Programmablaufplan
PBM	<i>probability based matching</i> , wahrscheinlichkeitsbasierte Übereinstimmung
PC	Personal Computer
PDI	<i>plasma desorption and ionization</i> , Plasma-Desorption und Ionisierung
ppm	<i>parts per million</i> , Teile pro Million
PSE	Periodensystem der Elemente
RDB-Äquivalent	Ring-Doppelbindungsäquivalent
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher

SISCOM	<i>similarity by using a specific type of coding and multiple matching factor assessment</i> , Ähnlichkeit durch Verwendung einer speziellen Kodierung und mehrfacher Bewertung der Übereinstimmung
SORI	<i>sustained off-resonance irradiation</i> , anhaltende resonanznahe Bestrahlung
STIRS	<i>self training interpretive retrieval system</i> , selbstlernendes, interpretierendes Abfragesystem
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TOF-MS	<i>time of flight mass spectrometer</i> , Flugzeit-Massenspektrometer
UV	<i>ultra violet</i> , ultraviolett

1. Einleitung

Die Massenspektrometrie ist eines der ältesten Verfahren zur Charakterisierung von Atom- und Moleküleigenschaften. J. J. Thomson konnte Ende des 19. Jahrhunderts die Masse von Ionen in Kathodenstrahlen durch den Einfluss elektrischer und magnetischer Felder bestimmen. Basierend auf diesen Arbeiten wurde von ihm 1897 das Elektron entdeckt und F. W. Aston gelang der Nachweis natürlicher Isotope verschiedener Elemente wofür beide mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden.

Seitdem entwickelte sich die Massenspektrometrie zu einer der leistungsfähigsten Methoden in der chemischen Analytik, die sich besonders durch ihre hohe Selektivität und den sehr geringen Probenbedarf im fmol-Bereich auszeichnet. Mit der Einführung der Ionisierungsmethoden *Fast Atom Bombardment* (FAB), *Field Desorption and Ionization* (FDI), *Electrospray Ionization* (ESI), *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization* (MALDI) und *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), bei denen die Desorption nicht vom Dampfdruck der untersuchten Substanz abhängt und die demzufolge nicht auf thermisch stabile, leicht flüchtige, unpolare Substanzen beschränkt sind, konnten die Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie stark erweitert werden.

Die fortschreitende Automatisierung in der chemischen Reaktionsdurchführung und Analytik in den letzten drei bis vier Dekaden ermöglichte die Einführung kombinatorischer Methoden zur Synthetisierung neuer Substanzen, die zu einer großen Anzahl an Reaktionsprodukten führen. Die chemische Charakterisierung der Produkte durch Massenspektrometrie ist in diesen Dimensionen mit den herkömmlichen Methoden zeitaufwendig und somit nur bedingt geeignet, da sie zumeist eine manuelle Auswertung der Massenspektren erfordert. Die automatisierte Auswertung von Massenspektren durch den Vergleich eines experimentellen Spektrums mit Referenzspektren einer Bibliothek beschränkt sich auf Massenspektren mit nomineller Massenauflösung, die mit der fragmentierungsreichen Elektronenstoßionisierung (EI) bzw. der Chemischen Ionisierung (CI) aufgenommen wurden, und ist somit durch den begrenzten Anwendungsbereich dieser Ionisierungsmethoden limitiert.

Kennzeichen moderner Massenspektrometer sind ihr hohes Auflösungsvermögen und die damit einhergehende hohe Genauigkeit bei der Bestimmung der Masse eines Ions. Mit hochauflösenden Massenspektrometern können routinemäßig relative Genauigkeiten von ± 10 ppm erreicht werden. Mit höchstauflösenden FTICR-Massenspektrometern sind sogar Massengenauigkeiten im sub-ppm Bereich erreichbar. Die gebräuchlichsten Ionisierungsmethoden und hochauflösenden Massenspektrometer werden in Kapitel 2 vorgestellt.

Die Masse eines Elementes, oder präziser die Massen von dessen Isotopen, sind, bedingt durch den Massendefekt bei der Bildung ihrer Kerne, keine ganzzahligen Vielfachen der Massen ihrer Nukleonen. Weil jede chemische Verbindung aus einer Kombination von Elementen zusammengesetzt ist, hat sie damit auch eine charakteristische Masse und es besteht die Möglichkeit, aus einer hinreichend genau bestimmten Masse einer Substanz auf deren elementare Zusammensetzung zu schließen.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Umsetzung von Algorithmen, die es, unter Ausnutzung der vorteilhaften Eigenschaften von hoch- und ultrahochauflösenden Massenspektrometern ermöglichen, die anfallenden Daten mit minimaler Interaktion des Nutzers auszuwerten. Dies ist Inhalt von Kapitel 3 und 4.

Die Grundlage dafür bildet die kombinatorische Zuordnung von Elementarkombinationen (EK) zur „exakt“ bestimmten Masse eines Ions, aus einer vorgegebenen Menge an Elementen. Da die Zahl der generierten EK mit ansteigender Ionenmasse exponentiell zunimmt, werden verschiedene Ansätze zur Einschränkung der Lösungsmenge vorgestellt.

Ein Erfolg versprechender Weg ist hierbei die Auswertung des experimentellen Isotopenmusters durch den Vergleich mit den theoretischen Mustern der EK, die einem Peak zugeordnet werden. Dies erfordert die Simulation des theoretischen Isotopenmusters einer beliebigen EK unter Berücksichtigung der experimentellen Auflösung und die Bewertung der Übereinstimmung beider Isotopenmuster.

Die Auswertung der Neutralverluste zwischen Mutter- und Tochterionen wird in einem so genannten Konsistenztest eingebettet und dient einerseits der weiteren Reduktion der Lösungsmenge, und andererseits der Bestimmung möglicher Fragmentierungspfade zwischen einem Mutterion und dessen Tochterionen. Dabei kann es sich beim Mutterion sowohl um das Molekülion als auch um ein Fragment

einer Verbindung handeln, dem durch MS^n -Experimente Tochterionen zugeordnet werden können.

Anhand verschiedener Beispiele wird in Kapitel 5 die Anwendung der vorgestellten Methoden zur Auswertung hoch- und ultrahochaufgelöster Massenspektren demonstriert.

2. Einführung

2.1. *Massenspektrometrie*

Unter Massenspektrometrie versteht man jede Methode, Ionen unterschiedlicher Masse und Ladung zu separieren und zu detektieren. Ein Massenspektrometer ist in diesem Sinne ein Gerät zum Wiegen von Ionen [1]. J. J. Thomson¹ und F. W. Aston² entwickelten das erste Gerät, mit dem sie durch elektrische Gasentladungen erzeugte Ionen massenselektiv trennen und auf fotografischen Platten sichtbar machen konnten [2].

Im Verlauf der folgenden Jahrzehnte wurde die Massenspektrometrie im Hinblick auf Empfindlichkeit, Genauigkeit, Auflösung, Massenbereich, Kopplung mit chromatographischen Separierungsmethoden (GC/LC/CE), die gezielte Fragmentierung (Tandem MS, MSⁿ) und Ionisierungsmethoden stark weiterentwickelt und zählt heute aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Aussagekraft zu den leistungsfähigsten Methoden der instrumentellen Analytik. Vor allem die Entwicklung der sanften Ionisierungsmethoden ESI und MALDI Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre hat die Anwendungsbereiche der Massenspektrometrie für die Charakterisierung biologischer Makromoleküle stark erweitert. Sie umfassen heute alle Bereiche der analytischen Chemie, angefangen beim klassischen Nachweis von Syntheseprodukten der pharmazeutischen oder katalytischen Forschung [3, 4] über die strukturelle Charakterisierung von Naturstoffen [5-8] und die Analyse komplexer Gemische [9-14] bis zu vielfältigen Anwendungen in der biomedizinischen Protein- und Erbgutforschung (Peptid, DNS/RNS - Sequenzierung) [15-23]. Auch bei der Erforschung des Sonnensystems werden massenspektrometrische Methoden eingesetzt. So wurden z.B. der Mondstaub der Apollo 11 Mission und die Bestandteile einer simulierten Atmosphäre des Saturnmondes Titan auf organische Bestandteile untersucht [24, 25].

¹ Nobelpreis für Physik 1906 „Als Anerkennung des großen Verdienstes, das er sich durch seine theoretischen und experimentellen Untersuchungen über den Durchgang der Elektrizität durch Gase erworben hat“ (<http://www.nobelpreis.org>).

² Nobelpreis für Chemie 1922 „Für seine Entdeckung einer großen Zahl von Isotopen in mehreren nicht radioaktiven Elementen mit Hilfe seines Massenspektrographen sowie für seine Entdeckung des sogenannten Gesetzes der Ganzzahligkeit“ (<http://www.nobelpreis.org>).

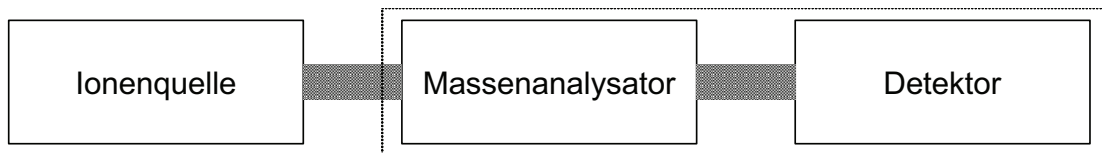


Abbildung 2.1: Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers

Trotz der Vielfalt der in der Massenspektrometrie angewandten Verfahren lässt sich jedes Massenspektrometer in drei in Abbildung 2.1 dargestellte Funktionseinheiten unterteilen. In der Ionenquelle wird der zu untersuchende Analyt in die Gasphase überführt (Desorption) und ionisiert. Der Massenanalysator trennt die erzeugten Ionen räumlich oder zeitlich nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis und führt diese dem Detektor zu, in dem die nach der Masse separierten Ionen quantitativ erfasst werden. Als Detektor werden heute überwiegend Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) eingesetzt, die aufgrund ihres hohen Verstärkungsfaktors auch für den Nachweis geringer Ionenströme geeignet sind. In den folgenden Abschnitten sollen einige der am häufigsten eingesetzten Ionisierungsmethoden und Massenanalysatoren vorgestellt werden.

2.1.1. Ionisierungsmethoden

Electron Impact Ionization (EI) and Chemical Ionization (CI)

Neben der thermischen Ionisierung ist die Elektronstoßionisierung eines der ersten Ionisierungsverfahren, das in Zusammenhang mit der MS Verwendung gefunden hat. Während bei der thermischen Ionisierung der Analyt durch Verdampfen im Vakuum in die Gasphase überführt und dabei zu einem geringen Anteil ionisiert wird, erfolgt die Ionisierung bei der Elektronenstoßionisierung durch gezielte Übertragung der Ionisierungsenergie auf die Probenmoleküle durch Zusammenstöße mit Elektronen. Dazu werden gasförmige Proben direkt eingelassen und flüssige und feste Proben durch Erhitzen im Vakuum verdampft und durch einen Elektronenstrahl geleitet, der ein elektrisches Potenzial von typischerweise 70 V durchlaufen hat (vgl. Abbildung 2.2). Durch unelastische Stöße zwischen den Elektronen und Molekülen wird die zur Ionisierung notwendige Energie übertragen. Die Ionisierungsschwelle liegt hierbei typischerweise bei 12 eV und das Ionisierungsoptimum mit dem größten Wirkungsquerschnitt liegt bei 70 eV [26].

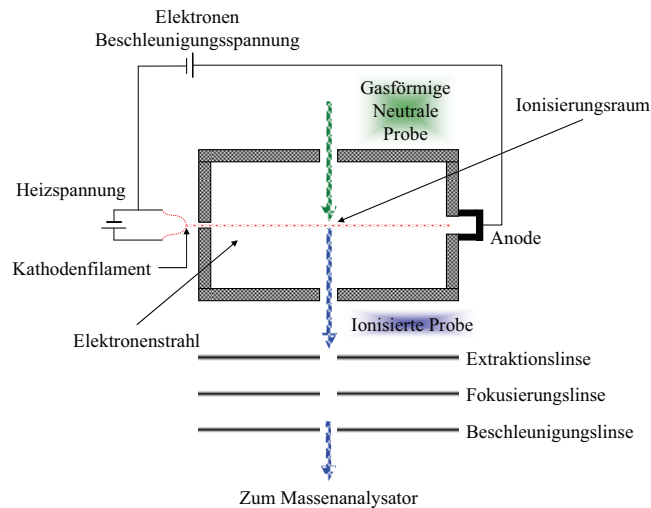


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer Elektronenstoß-Quelle

Durch das Herausschlagen eines Elektrons aus dem neutralen Molekül entstehen einfach positiv geladene Radikal-Molekülionen, welche durch die starke Anregung in einer Reihe von Zerfalls- und Umlagerungsreaktion weiter aufgespaltet werden können. Dies führt einerseits zur Bildung von Fragmentierungsmustern im Massenspektrum, welche mit der Struktur des Analyten korreliert sind und als molekularer „Fingerabdruck“ zur Strukturaufklärung genutzt werden, aber andererseits kann das intakte Molekülion durch vollständige Fragmentierung auch völlig aus dem Spektrum verschwinden, wodurch die wichtige Information über das Molekulargewicht des Analyten verloren geht. Aufgrund der Tendenz zu einer starken Fragmentierung spricht man bei EI auch von einer „harten“ Ionisierungsmethode. Die Fragmentierungsrate kann durch Variation der Ionisierungsenergie im Bereich von 10-120 eV beeinflusst werden [27], nichtsdestotrotz ist die Anwendbarkeit dieser Methode auf Moleküle mit einem Gewicht von einigen hundert Dalton beschränkt. Eine weitere Einschränkung liegt in der Notwendigkeit begründet, die Probe unzersetzt verdampfen zu können, wodurch EI nur für leicht flüchtige, unpolare und thermostabile Substanzen geeignet ist.

Durch Aufnahme eines Elektrons können auch negative Molekülionen entstehen, deren Lebensdauer mit weniger als 10^{-5} s aufgrund der dabei übertragenen hohen Anregungsenergien allerdings so gering ist, dass sie nicht nachgewiesen werden können und Elektronenstoß-Quellen nur im positiven Modus zur Aufnahme von Kationenspektren verwendet werden [28].

Die Chemische Ionisierung (CI) stellt eine Modifikation der Elektronenstoßionisierung dar. Durch Einbringen eines so genannten Puffergases in den Ionisierungsraum der Quelle (Isobutan, Methan) erfolgt die Ionisierung des Analyten hauptsächlich indirekt durch Sekundärreaktionen mit Ionen des Puffergases, das aufgrund seines hohen Überschusses primär vom Elektronenstrom ionisiert wird. Die Mechanismen der CI wurden 1966 von Munson *et al.* ausführlich beschrieben [29]. Bei CI können, durch Protonentransfer zwischen Puffer und Analyt und Protonenabspaltung, sowohl Pseudo-Molekülionen $(M+H)^+$, $(M-H)$ als auch Molekülionen $(M)^+$ und (M) durch Elektronenaustausch beobachtet werden. Da bei diesen Sekundärreaktionen weitaus geringere Energiemengen auf die Moleküle übertragen werden, ist bei der CI eine deutlich geringere Fragmentierung des Analyten zu beobachten. Die CI kann auch für die Erzeugung von stabilen negativ geladenen Ionen verwendet werden (NCI).

Häufig wird die CI in Kombination mit EI eingesetzt, da die Quelle für die Anwendung beider Methoden nicht modifiziert werden muss und sich die gewonnen Informationen beider Methoden (CI - Molekulargewicht, EI - Fragmente) komplementär ergänzen.

EI/CI-Quellen werden heute noch vielfach in GC/MS-Kopplungen eingesetzt.

Electrospray Ionization (ESI)

1989 präsentierten J. B. Fenn *et al.*³ den fragmentierungsfreien Nachweis eines 40 kDa schweren Proteins mit der von ihnen an der Yale Universität, auf den Arbeiten von Dole *et al.* basierenden [31], weiterentwickelten⁴ Elektrospray-Ionisierung (ESI) [33].

³ Nobelpreis 2002 für Chemie „*Development of Methods for Identification and Structure Analyses of Biological Macromolecules*“ [30].

⁴ Und unabhängig davon auch von Aleksandrov *et al.* in Leningrad [32].

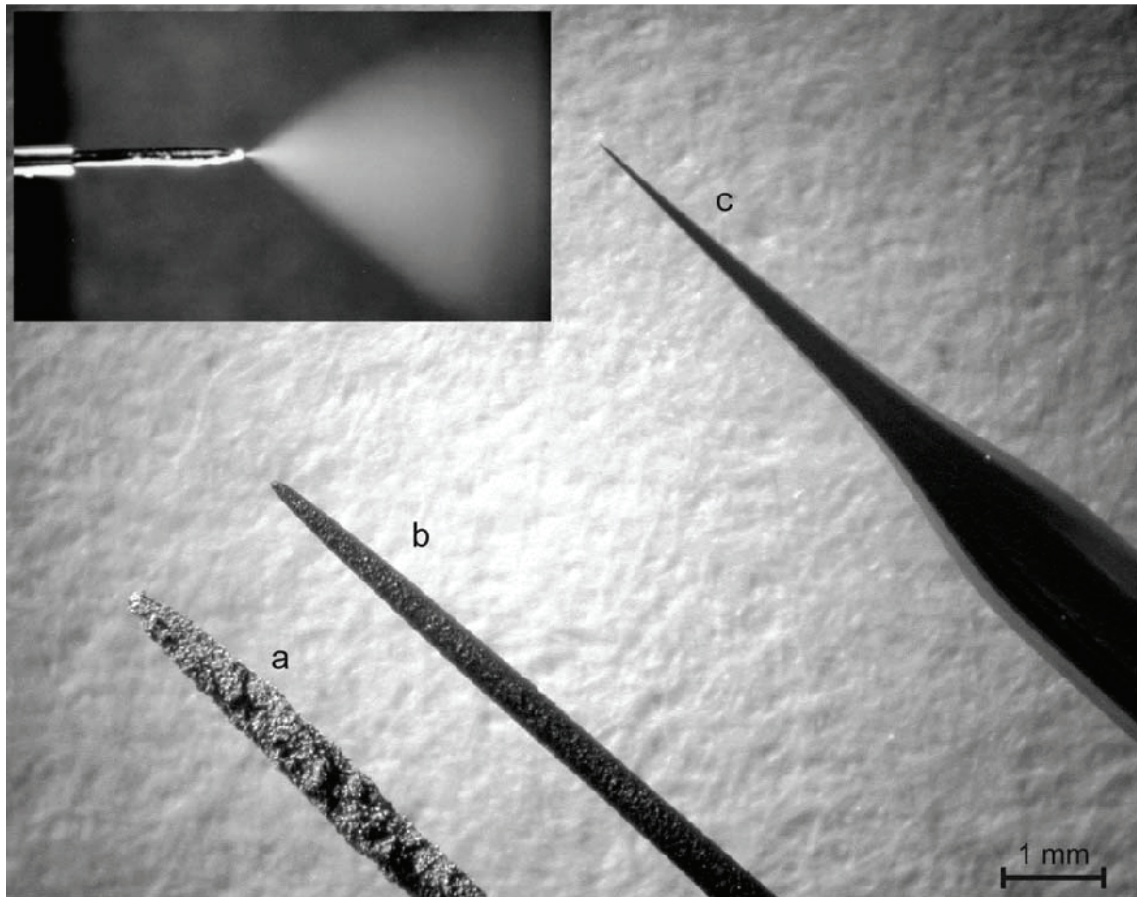


Abbildung 2.3: Vergrößerte Aufnahme von Elektrospray-Nadeln: Polyimid mit Gold a) und mit Graphit b) beschichtet und eine Metallbeschichtete Nanospray-Nadel c). Der Ausschnitt zeigt eine graphitbeschichtete Nadel beim Sprayvorgang [34].

Bei dieser Technologie wird die gelöste Probe durch eine dünne Metallkapillare ($d = 10 - 100 \mu\text{m}$) bei Atmosphärendruck (*Atmospheric Pressure Ionization* - API) mit einer Flussrate von $1 \mu\text{l} / \text{min}$ in ein elektrisches Feld gesprüht (vgl. Abbildung 2.3). An der Spitze der Kapillare, im so genannten Taylor Konus, sammeln sich je nach Ausrichtung des elektrostatischen Feldes positiv oder negativ geladene Ionen. Die Polarisierung des Lösungsmittels an der Kapillarspitze führt zur Freisetzung geladener Tröpfchen aus dem Taylor Konus. Zunächst haben diese Tröpfchen einen Durchmesser von wenigen Mikrometern und tragen etwa 10^5 Elementarladungen. Unterstützt durch einen Gegenstrom aus erhitztem Stickstoff ($100-400^\circ\text{C}$) verdampft das Lösungsmittel kontinuierlich und die Ladungsdichte im Tropfen nimmt zu. Ab einem bestimmten kritischen Durchmesser überwiegen die Coulombschen Abstoßungskräfte der gleichartig geladenen Ionen im Tropfen gegenüber der Oberflächenspannung (Raleigh Limit: $Q^2 \geq 8 * \pi^2 * \epsilon_0 * \gamma * D^3$,

D = Tropfendurchmesser, Q = Ladung, γ = Oberflächenspannung) und der Tropfen zerfällt in einer Reihe von Coloumb-Explosionen [35]. Über den endgültigen Übergang der geladenen Tröpfchen in die Gasphase herrscht zurzeit noch Dissens. Nach der „*single ion droplet*“- Theorie von Röllgen und Dole erfolgt der Übergang schrittweise durch die Bildung immer kleinerer Tröpfchen, bis nur noch einzelne, geladene Analytionen vorliegen (Abbildung 2.4 Weg B). Nach dem Ionenemissionsmodell von Iribane und Thomson entstehen die separaten Analytionen durch direkte Emission aus den hochgeladenen Tröpfchen (Abbildung 2.4 Weg A) [36-38].

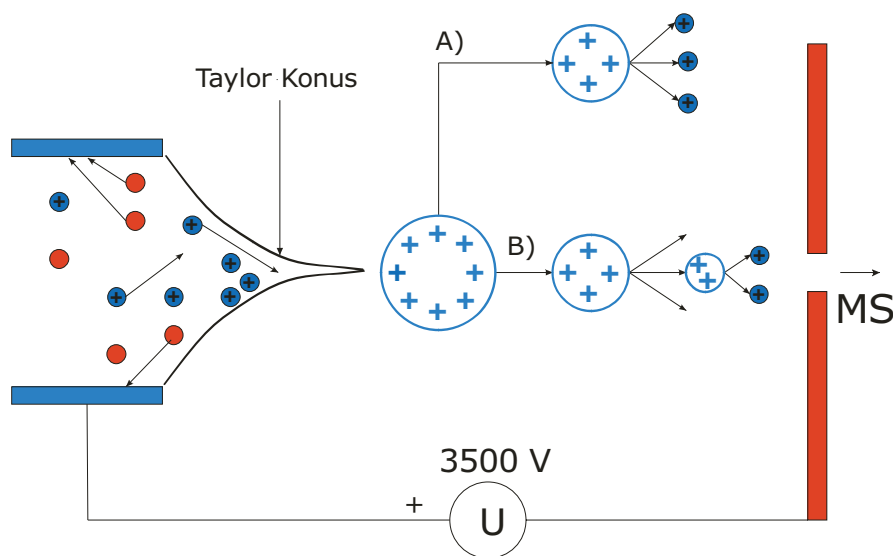


Abbildung 2.4: Prinzip der Elektrospray Ionisation (ESI)

Nach ihrer Erzeugung unter Atmosphärendruck werden die Ionen durch ein System von elektrostatischen Linen, einer Glaskapillare und über mehrere durch Skimmerlinsen getrennte Pumpstufen in den Vakuumbereich des Massenspektrometers überführt [39].

Als Lösungsmittel kommen bei ESI zumeist Mischungen aus Wasser und einer leicht flüchtigen, niedermolekularen, organischen Flüssigkeit zum Einsatz. Unter anderem verwendet man Mischungen aus Methanol/Wasser (50:50), Isopropanol/Wasser (50:50) und Acetonitril/Wasser (50:50). Zur Unterstützung der Ionisierung kann dem Lösungsmittel bei positiver ESI noch ein geringer Anteil (<2%) einer Säure (Ameisensäure) als Protonendonator und bei negativer ESI eine Base (Ammoniumverbindung) als Protonenakzeptor zugefügt werden. Da ausschließlich

polare Lösungsmittel eingesetzt werden können, muss auch die untersuchte Substanz einen polaren Charakter aufweisen.

Aufgrund der kontinuierlichen Erzeugung der Ionen und der flüssigen Probenzufuhr ist ESI gut für die Kopplung mit chromatographischen Trennverfahren (LC, CE) geeignet [40, 41]. Allerdings ist ESI sehr intolerant gegenüber hohen Salzgehalten (Natrium oder Kaliumsalze), was bei der Wahl des Flüssigphasensystems beachtet werden muss, da schon Spuren eines Salzes zur Bildung von Kationen-Addukten ($(M+Na)^+$, $(M+K)^+$) führen und eine zu hohe Salzkonzentrationen die Ausbildung einzelner Analytionen durch Auskristallisierung des Salzes im Tropfen verhindert und dadurch die Ionisierung empfindlich stört [42].

ESI ist eine sehr „weiche“, fragmentierungsarme Ionisierungsmethode, bei der einfach ($n=1$) und mehrfach geladene ($n>1$) Pseudo-Molekülionen $(M+nH)^{n+}$ $(M-nH)^n$ mit Masse-Ladungsverhältnissen bis etwa 2000 Th entstehen. Zusätzlich können noch die oben erwähnten Kationen-Addukte sowie Molekülcluster bestehend aus zwei und mehr Molekülen $(2M+H)^+$ auftreten [43]. Durch die Tendenz, mit zunehmender Molekülgröße mehrfach geladene Ionen zu erzeugen, können mit ESI auch schwere Makromoleküle in Massenspektrometern mit beschränktem Massenbereich nachgewiesen werden.

Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation

Die Möglichkeit der Desorption und Ionisierung von polaren nichtflüchtigen Substanzen durch Beschuss mit einem Infrarot-Laser (*Laser Desorption and Ionization* - LDI) wurde schon 1978 von Posthumus *et al.* vorgestellt [44]. Die Anwendung dieser Methode blieb aber auf spezielle Substanzklassen beschränkt, da für die effektive Übertragung der Laserenergie die Wellenlänge des verwendeten Lasers mit dem substanzspezifischen Absorptionsverhalten des untersuchten Analyten übereinstimmen muss. Erst die Einführung einer organischen, Licht absorbierenden Matrix als Mittler zwischen Substanz und Laserlicht erweiterte den Anwendungsbereich dieser Methode rapide. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation* (MALDI) wurde 1988 von Karas und Hillenkamp [45] und unabhängig davon von Tanaka *et al.*⁵ vorgestellt [47]. Bei MALDI wird die zu untersuchende gelöste Substanz mit einer flüssigen oder gelösten kristallinen Matrix gemischt und

⁵ Nobelpreis 2002 für Chemie „*Development of Methods for Identification and Structure Analyses of Biological Macromolecules*“ [46].

auf einem Probenträger auskristallisiert. Die Kristalle werden im Vakuum mit einem kurzen intensiven Laserpuls ($t < 10 \text{ ns}$, $10^6\text{-}10^7 \text{ W/cm}^2$) beschossen, dessen Wellenlänge auf das Absorptionsverhalten der Matrix abgestimmt ist. Dabei werden die Kristalle auf bis zu 1000 K erhitzt und verdampfen explosionsartig. Ursprünglich verwendete man nur UV-Laser (N_2 Laser, 337 nm; ND:YAG'3, 355 nm; ND:YAG'4, 266 nm) in Verbindung mit einer niedermolekularen aromatischen Carboxylsäure als Matrix, deren Ring für die resonante Absorption des ultravioletten Laserlichtes verantwortlich ist (Tabelle 2.1) [48, 49]. Durch die Verwendung von Infrarotlasern (CO_2 ; 10600 nm, Pulsdauer bis 200 ns) in Verbindung mit neuen Matrizen konnte der Massenbereich, der mit MALDI untersucht werden kann, von einigen 10 kDa auf mehrere 100 kDa gesteigert werden [50-52]. Die Matrix liegt im Kristall üblicherweise in einem hohen molaren Überschuss vor ($100\text{-}10^6\text{:}1$) und muss einige notwendige Eigenschaften aufweisen:

- die Matrix muss das Laserlicht absorbieren
- die Matrix muss den Analyten durch Bildung eines Mischkristalls einbetten können, was die Löslichkeit des Analyten im Lösungsmittel der Matrix erfordert
- die Matrix muss die Ionisierung des Analyten begünstigen
- die Matrix muss vakuumstabil sein

Obwohl der Vorgang der Desorption/Ionisation bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist und verschiedene Modelle entwickelt wurden, gilt als wahrscheinlich, dass die Ionisierung des Analyten bei IR-MALDI wie bei LDI schon auf dem Probenträger durch thermische Ionisation erfolgt und bei UV-MALDI durch Ladungsaustausch zwischen Matrix und Analyten in der entstehenden Partikelwolke kurz nach der Desorption des Analyt-Matrix Gemisches (Abbildung 2.5) [53, 54].

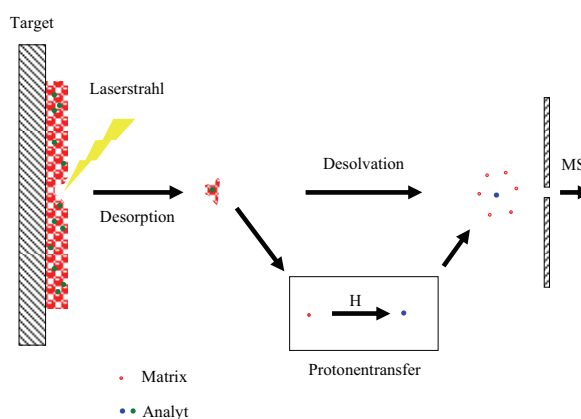


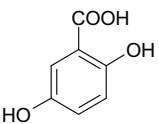
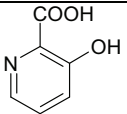
Abbildung 2.5: Prinzip der „Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization“ (MALDI)

Ein umfassender Überblick über die verschiedenen Ionisierungsmechanismen bei MALDI wurde von Zenobi *et al.* veröffentlicht [55].

Bei MALDI entstehen zum überwiegenden Teil einfach geladene protonierte $(M+H)^+$ und deprotonierte $(M-H)$ Pseudo-Molekülionen, weshalb gegebenenfalls Ionen mit sehr großen Massen-Ladungsverhältnissen detektiert werden müssen (150000 Th und mehr) [56]. Aus diesem Grund werden MALDI-Quellen bevorzugt mit „Time of Flight“ Massenspektrometern (TOF-MS) gekoppelt, die einen nahezu unbegrenzten Massenbereich erfassen können.

Tabelle 2.1: Häufig verwendete UV-MALDI Matrizen und deren Anwendung

Matrix	λ/nm^a	Anwendung	Struktur
<i>Sinapinic acid (SA), 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid</i>	266, 337, 355	Proteine, Polymere > 10 kDa	
<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)</i>	337, 355	Peptide < 10 kDa	

Matrix	λ/nm^a	Anwendung	Struktur
<i>Genistic acid</i> , <i>2,5-Dihydroxybenzoic acid</i> (DHB)	266, 337, 355	Peptide, Proteine,	
		Lipide,	
		Nukleinsäuren,	
		Sacharide, Polare organische Moleküle	
<i>3-Hydroxypicolinic acid</i> (HPA), <i>3-Hydroxy-2-pyridinecarboxylic acid</i>	337	Nukleinsäuren, > 3,5 kDa	
a) Die folgenden Laser werden verwendet: 266 nm ND:YAG'4, 337 nm N ₂ , 355 nm ND:YAG'3			

MALDI ist weitaus weniger empfindlich gegenüber dem Gehalt an nichtflüchtigen Kationen in der Probe als ESI, allerdings kann auch hier ein zu hoher Salzgehalt die Spektrenqualität vermindern, da bei niedrigauflösenden Analysatoren die protonierten Pseudo-Molekülonen unter Umständen nicht von den Kationenaddukten unterschieden werden können und eine genaue Massenbestimmung durch Überlagerung beider Spezies unmöglich wird. Auch bei quantitativen Untersuchungen ist auf eine hohe Reinheit des Analyten zu achten, damit die Kristallisation möglichst gleichmäßig erfolgt, was je nach Anwendungsfall aufwändige Aufreinigungsprozeduren erfordert [57]. Im Gegensatz zu ESI verursacht der Einsatz einer Matrix bei MALDI das Auftreten eines chemischen Rauschens im Spektrum, welches je nach verwendeter Matrix vor allem im unteren Massenbereich auftritt (< 500 Th) [58].

Die Vielzahl und Komplexität an Probenvorbereitungsprozeduren und das für die Ionisierung notwendige Vakuum erschweren eine direkte Ankopplung dieser Ionisierungsmethode an chromatographische Trennmethode. Es gibt einige beschriebene Ansätze, bei denen es sich aber um *offline*-Kopplungen handelt, d.h. die Proben werden erst auf dem Probenträger gesammelt und dann dem MS zugeführt [59].

Weitere Ionisierungsmethoden und neue Entwicklungen

Bevor ESI und MALDI die Schlüsselrolle bei der Analyse nichtflüchtiger Substanzen und biologischer Makromoleküle übernahmen, wurden für diese Zwecke die Ionisierungsmethoden *Fast Atom Bombardment* (FAB) [60-62], *Field Desorption and Ionization* (FDI) [63-65] und *Plasma Desorption and Ionization* (PDI) [66] erfolgreich

eingesetzt. Mit Hilfe von FAB und PDI gelang erstmals der Nachweis kleinerer Oligosacharide und Peptide. Aufgrund des relativ hohen Probenbedarfes (nmol-Bereich), der Tendenz, größere Moleküle zu fragmentieren (PDI, FAB), einem starken chemischen Rauschen aufgrund des Einsatzes von Matrizen (FAB) und eines hohen instrumentellen Aufwandes (FDI) werden diese Ionisierungsmethoden heute kaum noch verwendet.

Erst die Entwicklung von weichen fragmentierungsarmen Ionisierungsmethoden, die für nichtflüchtige Substanzen geeignet sind, machte die MS zu einem leistungsfähigen Werkzeug für die Biochemie. Tanaka und Fenn wurden für ihren Beitrag auf diesem Gebiet 2002 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [30, 46].

Einige neue Entwicklungen sollen in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben. Nennenswert ist die Entwicklung der so genannten nano-ESI-Methode, die im Gegensatz zur herkömmlichen ESI mit geringeren Flussraten (nl/min statt $\mu\text{l/min}$) und aus diesem Grund mit deutlich geringeren Substanzmengen auskommt [67]. Des Weiteren eröffnet die Entwicklung der Desorption-ESI (DESI) im Hinblick auf die Entwicklung kleiner transportabler Massenspektrometer interessante Perspektiven, da bei dieser Methode der Analyt nicht mehr in einem Lösungsmittel gelöst werden muss, sondern direkt „aus der Umwelt“ (*Ambient-MS*) analysiert werden kann [68, 69]. Auf dem Gebiet der MALDI ist die Entwicklung von flüssigen Matrizen zu nennen, in denen sich der Analyt weitaus homogener verteilt, was zu einer erhöhten quantitativen Reproduzierbarkeit einzelner Messungen führt [70, 71]. Die Kopplung des MALDI-Prinzips mit einem *API-Interface*, wie es bei ESI verwendet wird, führte zur Entwicklung der *Atmospheric Pressure-MALDI* (AP-MALDI) [72]. AP-MALDI ist einerseits eine noch fragmentierungsärmere Methode als die herkömmliche MALDI und damit auch für die Untersuchung sehr labiler Moleküle wie z.B. langkettiger Oligoribonukleinsäuren geeignet [73]. Andererseits ermöglicht die Ionisierung unter Atmosphärendruck auch eine *online*-Ankopplung dieser Quelle an chromatographische Methoden und damit die Möglichkeit einer vollständigen Automatisierung [74]. Durch die Verwendung neuer Präparierungsmethoden, die vollständig ohne den Einsatz eines organischen Lösungsmittels auskommen (*Solvent Free-MALDI*), konnten erstmals schwerlösliche Polymere mit MALDI untersucht werden [75] [76].

2.1.2. Massenselektive Analysatoren

Die massenselektive Separation der erzeugten Ionen beruht unabhängig vom verwendeten Analysator auf der Kraftwirkung elektrischer (Coulombkraft: $\vec{F}_e = q * \vec{E}$) und magnetischer (Lorentzkraft: $\vec{F}_L = q * \vec{v} \times \vec{B}$) Felder auf bewegte geladene ($q = e * z$, z = Ladungszahl, e = Elementarladung) Körper und wird durch die Maxwellschen Gleichungen beschrieben. Beim Durchlaufen elektrischer Felder verändert sich die kinetische Energie ($E_{kin} = \frac{m * v^2}{2}$) der geladenen Teilchen (Ionen) durch Aufnahme oder Abgabe elektrischer Energie ($E_{el} = q * U$) und damit ihre Geschwindigkeit ($v = \sqrt{\frac{q * U * 2}{m}}$). Magnetische Felder führen zu einer Änderung der Bewegungsrichtung (Ablenkung), wobei der Energiebetrag und damit die Geschwindigkeit der Ionen konstant bleiben. Die Kraft, die der ablenkenden Lorentzkraft entgegenwirkt, ist die Radialkraft ($\vec{F}_r = \frac{m * \vec{v}^2}{\vec{r}}$). Sind beide Kräfte, die per Definition immer in entgegengesetzte Richtungen wirken, betragsmäßig gleich groß, wird das Ion auf eine Kreisbahn gezwungen.

Sektorfeld-MS

Das erste im Jahre 1940 kommerziell erhältliche Massenspektrometer war ein Sektorfeldgerät. Die frühen Geräte wiesen meist nur einen magnetischen Feldsektor auf. Dieser befindet sich im Vakuum und wird von den Ionen durchflogen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen unterschiedlich stark abgelenkt werden und anschließend auf einem Schirm an unterschiedlichen Orten detektiert werden konnten. Die in der Quelle erzeugten Ionen verlassen diese nach Durchlaufen eines elektrischen Feldes (Beschleunigungsspannung U_B) mit der Geschwindigkeit

$v = \sqrt{\frac{q * U_B * 2}{m}}$. Beim Eintritt in das homogene Feld (B) des magnetischen Sektors

wirken wie oben dargestellt die beiden Kräfte Lorentz- und die Radialkraft und lenken das Ion auf eine Kreisbahn mit dem Radius r_m . Durch Gleichsetzen der beiden Kräfte F_r und F_L und Einsetzen der Geschwindigkeit erhält man für den Radius der

Kreisbahn $r_m = \sqrt{\frac{2 * m * U_B}{z * e * B^2}}$ [77]. Man erkennt, dass der Radius der Flugbahn, und

damit die Flugrichtung, nach Verlassen des Sektors, nur von der Beschleunigungsspannung U_B , der Flussdichte B des magnetischen Sektors und vom Masse-Ladungsverhältnis m/z des Ions abhängig ist. Moderne Sektorfeldgeräte beinhalten heutzutage sowohl einen magnetischen als auch einen vor- oder nachgeschalteten elektrischen Feldsektor [78]. Die Ionen haben nach Verlassen der Quelle nicht alle das gleiche elektrische Potenzial durchlaufen, da sie nicht alle an demselben Punkt und zum selben Zeitpunkt erzeugt werden. Des Weiteren haben die Ionen vor ihrer Beschleunigung unterschiedliche Startgeschwindigkeiten, da die Übertragung der thermischen Energie bei der Desorption nicht gleichmäßig erfolgt. Deshalb haben auch Ionen mit dem gleichen Masse-Ladungsverhältnis leicht unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten, man spricht von einer Energiedispersion. Der elektrische Sektor hat die Aufgabe, die Energiedispersion der Ionen zu kompensieren, damit Ionen gleicher Masse am gleichen Punkt detektiert werden und die Auflösung auf der Massenskala erhöht wird. Sektorfeld-MS detektieren die Ionen normalerweise nur an einem Punkt, d.h. bei einem bestimmten Kurvenradius r_m . Um Ionen verschiedener Masse nachzuweisen, werden die Feldparameter (U_B und/oder B) variiert und dadurch der interessierende Massenbereich „gescannt“.

Der erfassbare Massenbereich hängt von der maximal einstellbaren Feldstärke des magnetischen Sektors ab und liegt bei kommerziellen Geräten zwischen 3.000 - 5.000 Th. Moderne Sektorfeldgeräte erreichen Auflösungen von bis zu 150.000 (10% Tal-Kriterium) und zählen damit zu den hoch- und zum Teil zu den ultrahochauflösenden Massenspektrometern [19].

Time of Flight-MS (TOF-MS)

Stephens und Cameron stellten 1946 bzw. 1948 ein Massenspektrometer vor, welches vollkommen ohne die Wirkung magnetischer Felder auskam und auf der Messung der Flugzeit von Ionen in einem feldfreien Raum (Driftstrecke) beruhte [79, 80]. In TOF-Massenspektrometern werden die Ionen wie bei den Sektorfeldgeräten nach ihrer Erzeugung durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt und erhalten eine von ihrem Masse-Ladungsverhältnis abhängige Geschwindigkeit v . Je schwerer ein Ion ist (m/z), desto langsamer durchfliegt es die Driftstrecke und desto später erreicht es den Detektor. Der Betrag der Geschwindigkeit ergibt sich auch hier

wieder durch $v = \sqrt{\frac{q \cdot U_B \cdot 2}{m}}$. Die Zeit zwischen der Erzeugung eines Ions und seiner

Detektion, die Flugzeit oder auch Driftzeit t_d des Ions, ergibt sich aus der Geschwindigkeit v und der Länge der Driftstrecke s_d (typisch sind 1-2 m) zu

$t_d = \sqrt{\frac{m}{2 \cdot q \cdot U_B}} \cdot s_d$ [81, 82]. Mit TOF-MS, die nach diesem linearen Prinzip arbeiten

(linear-TOF), kann man aufgrund der oben beschriebenen Energiedistribution, welche sich auf die Flugzeit von Ionen desselben Masse-Ladungsverhältnisses und damit auf deren detektierte Massen auswirkt, nur geringe Auflösungen bis maximal 1000 erreichen.

Durch den Einsatz eines Reflektrons bzw. Ionenspiegels kann die Energiedistribution teilweise kompensiert werden (Reflektor-TOF). Dieser wird in der Driftstrecke der Ionen platziert und erzeugt ein statisches, elektrisches Feld, das so ausgerichtet ist, dass es die einfliegenden Ionen abbremst und danach in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt (reflektiert). Die ausgleichende Wirkung des Ionenspiegels beruht auf der Tatsache, dass Ionen mit dem gleichen Masse-Ladungsverhältnis (m/z) und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, unterschiedlich weit in das Reflektorfeld eindringen. Schnellere Ionen fliegen weiter in den Ionenspiegel, bevor sich ihre Bewegungsrichtung umkehrt und brauchen demzufolge auch länger, um den Reflektor zu durchfliegen. Durch geeignete Wahl der Betriebsparameter des Reflektrons kann der Zeitverlust so eingestellt werden, dass alle Ionen eines Masse-Ladungsverhältnisses den Detektor gleichzeitig erreichen [83].

Eine weitere Möglichkeit zur Auflösungsverbesserung im Zusammenhang mit MALDI-Quellen besteht in der verzögerten Freisetzung der Ionen aus der Quelle („*delayed extraction*“). Hierbei werden die Ionen nach ihrer Erzeugung nicht direkt beschleunigt, sondern erst in einem kleinen definierten Raum über dem Probenträger gesammelt. Nach einer kurzen Verweildauer der Ionen über dem Probenträger in der sich ihre kinetischen Energien angleichen, wird das Beschleunigungspotenzial angelegt. Die so erzeugten Ionen durchlaufen dann alle dasselbe Beschleunigungspotenzial, da sie alle am gleichen Ort starten, und weisen eine stark reduzierte Energiedistribution auf [84-86]. Mit TOF-Spektrometern, die beide Prinzipien verwenden, können Auflösungen von 10.000 bis zu 25.000 erreicht werden [87].

Die Notwendigkeit, bei TOF-Geräten möglichst kurze kompakte Ionenpakete zu erzeugen, ist ein weiterer Grund für die bevorzugte Kopplung mit MALDI-Quellen, da diese aufgrund des kurzen Laserimpulses prinzipiell zeitlich begrenzte Ionenströme hervorbringen. Für die Kopplung mit kontinuierlich arbeitenden Quellen (ESI, EI, etc.) müssen Vorrichtungen hinzugefügt werden, die eine gepulste Freisetzung der Ionen ermöglichen. Das geschieht zumeist mittels Ionenfallen (Quadrupol, Hexapole, Octopole), in denen die Ionen eine bestimmte Zeit gesammelt werden, bevor sie von einer „Pusher“-Elektrode in die Driftstrecke geleitet werden (*orthogonal acceleration*-TOF) [88, 89].

Die Vorteile von TOF-MS liegen in einem sehr großen erfassbaren Massenbereich (10000 – 20000 Th im Reflektormodus, >100000 Th im linearen Betrieb), der kurzen Messdauer (< 100 ms) und dem relativ preiswerten Aufbau.

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance - MS (FTICR-MS)

1932 stellten Lawrence und Livingston eine Apparatur vor, die sie als Zyklotron bezeichneten und mit der sie leichte Ionen zwischen zwei zylindrischen Elektroden in einem gleichförmigen magnetischen Feld⁶ durch Anlegen einer relativ geringen Wechselspannung auf hohe kinetische Energien beschleunigen konnten [90]. Penning gelang es, durch Hinzufügen zweier Elektroden an den Enden des Zylinders, die Ionen für längere Zeit zu speichern, was unter dem Namen „*Penning Trap*“ (Ionenfalle) bekannt geworden ist [91].

Das Prinzip der kreisförmigen Bewegung von Ionen im homogenen magnetischen Feld wurde schon in Abschnitt 2.1.2 beschrieben und beruht auf dem

zusammenwirken der Radialkraft $\vec{F}_z = \frac{m \cdot \vec{v}^2}{\vec{r}}$ und der Lorentzkraft $\vec{F}_L = q \cdot \vec{v} \times \vec{B}_0$ in

homogenen magnetischen Feldern. Im Gleichgewichtsfall bewegen sich die Ionen auf einer Kreisbahn, deren Rotationsfrequenz, die auch als Zyklotronfrequenz bezeichnet wird, durch Gleichsetzen beider Kräfte bestimmt werden kann

$$f_c = \frac{q \cdot B_0}{2 \cdot \pi \cdot m} = \frac{1.535611 \cdot 10^7 B_0}{m/z} \quad \text{mit} \quad \omega = \frac{v_{xy}}{r} = 2 \cdot \pi \cdot f_c.$$

⁶ Das magnetische Feld war zu diesem Zeitpunkt noch nicht homogen.

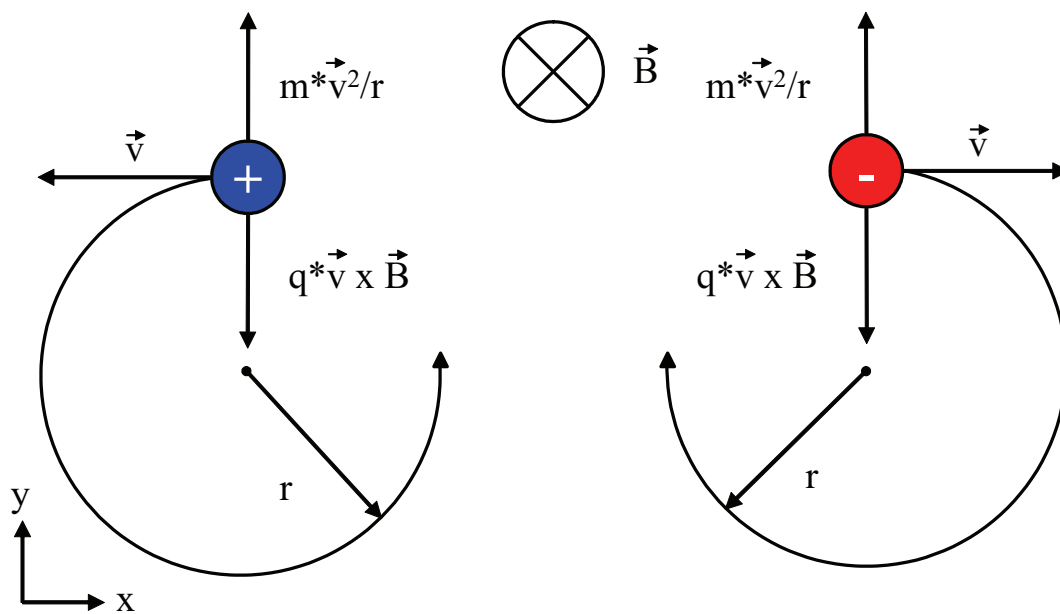


Abbildung 2.6: Die einwirkenden Kräfte und die resultierende Bewegung positiv und negativ geladener Teilchen in homogenen magnetischen Feldern. Die magnetischen Feldlinien stehen senkrecht auf der Zeichnungsebene.

Man erkennt, dass die Zyklotronfrequenz nur von der magnetischen Flussdichte B_0 und vom Masse-Ladungsverhältnis abhängt und unabhängig von der Geschwindigkeit v und damit von der kinetischen Energie der Ionen ist. Hierin liegt der große Vorteil dieses Prinzips begründet, da die kinetische Energieverteilung der Ionen keinen Einfluss auf das Messergebnis hat und die Zyklotronfrequenz sehr genau bestimmt werden kann. 1965 kam das erste kommerzielle Massenspektrometer auf den Markt (Varian Associates), welches auf dem ICR-Prinzip beruhte. Die Rotationsfrequenzen der Ionen wurden induktiv in einer zusätzlichen zylindrischen Messzelle bestimmt, nachdem sie zuvor durch ein elektrisches Wechselfeld zwischen entgegengesetzt angeordneten Elektroden resonant angeregt und auf eine höhere Bahngeschwindigkeit und damit auf einen größeren Rotationsradius gebracht worden sind. Neben größeren Bahnradien ist ein weiteres Ziel der Anregung die Erzeugung kohärenter Ionenpakete, damit alle Ionen mit dem gleichen Masse-Ladungsverhältnis ein phasengleiches Signal induzieren. Ionenfalle und Messzelle wurden 1971 in einer Zelle vereinigt und in den folgenden Jahrzehnten weiterentwickelt [92].

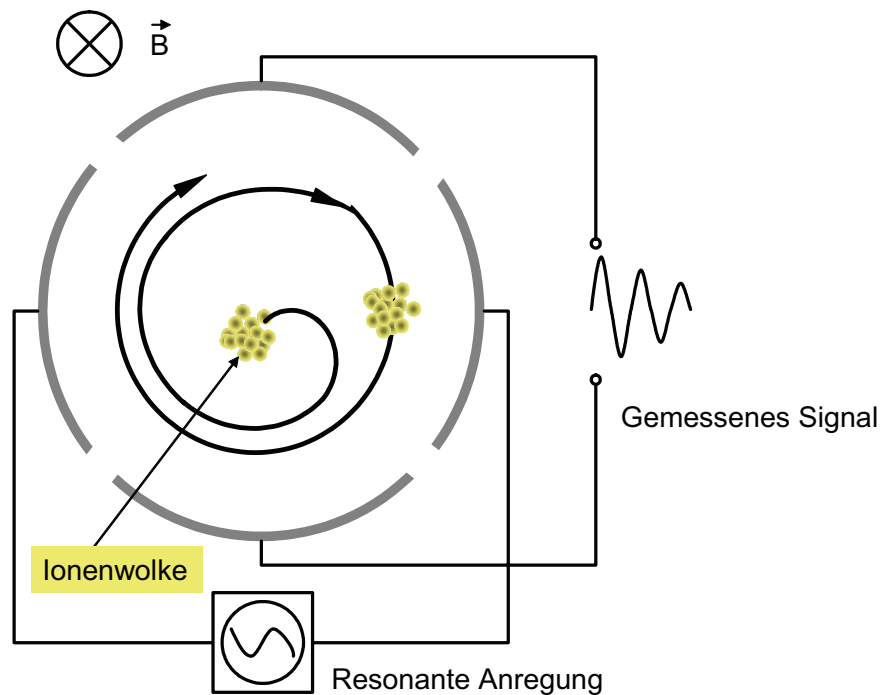


Abbildung 2.7: Vereinfachte Darstellung der Anregung eines Paketes Ionen gleicher Masse und der nachfolgenden Detektion des induzierten Signals.

Durch die Einwirkung des Trapping-Potenzials wird die Zyklotronbewegung durch zwei weitere in Abbildung 2.8 dargestellte Bewegungen, die Magnetronbewegung und die Trappingbewegung, überlagert. Die Magnetronbewegung hat direkten Einfluss auf die gemessene Zyklotronfrequenz, da sie den theoretischen Wert ω_c durch einen Offset ω_m (der Magnetronfrequenz) vergrößert [93]. Durch Kalibrierung und eine geeignete Geometrie des Trappingfeldes kann der Einfluss der Magnetronbewegung auf das Messergebnis neutralisiert und die dem Masse-Ladungsverhältnis entsprechende Zyklotronfrequenz bestimmt werden.

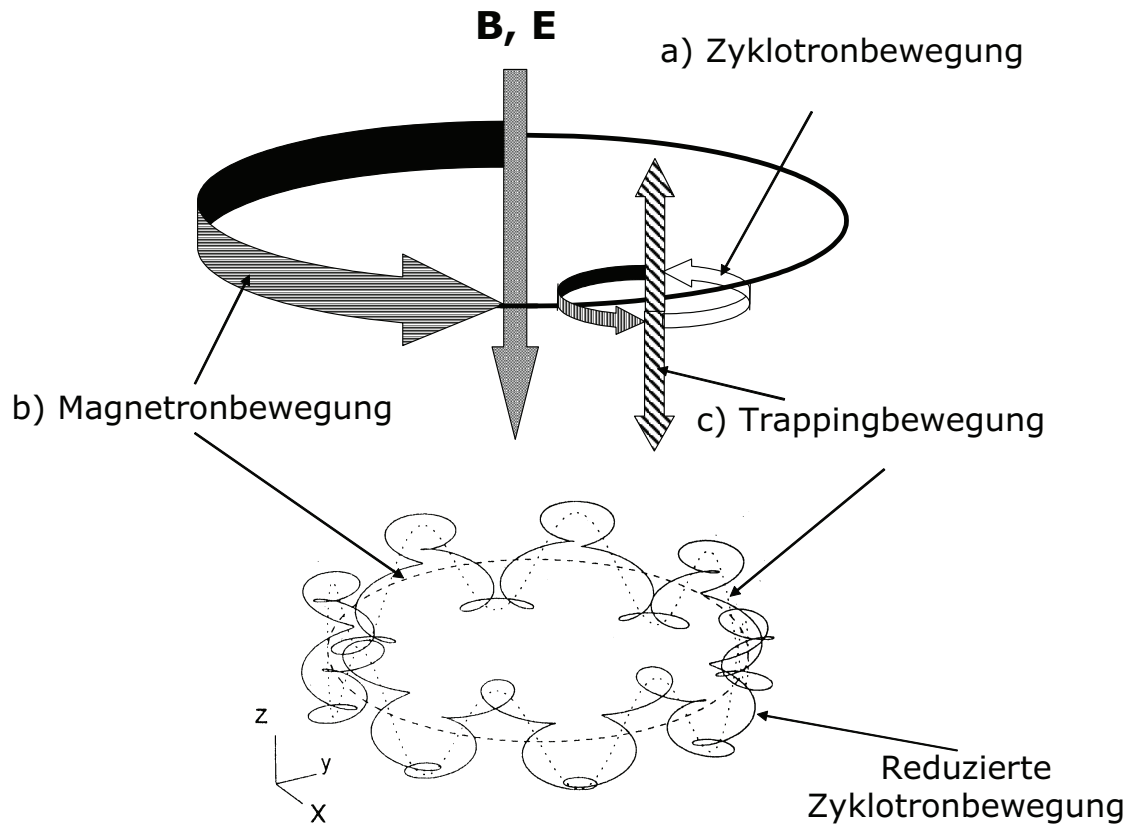


Abbildung 2.8: Die Zyklotronbewegung a) wird in der Realität noch durch zwei weitere Bewegungen überlagert: b) Magnetronbewegung in der z-Ebene folgt aus dem Zusammenwirken von magnetischen und elektrischen Feld in der Analysatorzelle, c) Pendelbewegung der Ionen entlang der z-Achse aufgrund des Trapping-Potenzials [93, 94]. Die aus der Überlagerung der Einzelbewegungen resultierende Flugbahn eines Ions ist in der unteren Grafik dargestellt.

Trotz der Möglichkeit, einzelne Ionenmassen sehr genau zu bestimmen, konnte sich die ICR-MS zu Beginn ihrer Einführung nicht durchsetzen, da die Zeit, die für die Aufnahme eines Massenspektrums benötigt wurde, mit über 20 Minuten vergleichsweise hoch war. ICR-Massenspektrometer werden im „Scan-Modus“ betrieben, bei dem immer genau eine Anregungsfrequenz (Ionenmasse) eingestellt und die Signalantwort detektiert wird. Für die Aufnahme eines größeren Massenbereichs müssen viele aufeinander folgende Messungen durchgeführt werden, bei denen der interessierende Massenbereich Punkt für Punkt abgetastet wird.

Der Durchbruch dieses Analysatortyps erfolgte erst mit der Entwicklung schneller AD-Wandler und leistungsfähiger Computer, die es ermöglichten, komplexe Signale digital zu detektieren und auszuwerten. Fourier hatte schon 1822 gezeigt, dass sich

jedes Signal durch eine Überlagerung von Sinus- und Kosinusfunktionen beschreiben lässt [95]. Angewandt auf das Problem der ICR-MS ist es dadurch möglich, mehrere überlagerte Zyklotronfrequenzen verschieden schwerer Ionen in einem einzigen detektierten Signal durch diskrete Fourier-Transformation gleichzeitig zu bestimmen und den Zeitbedarf für die Erfassung eines großen Massenbereiches drastisch (Faktor 10.000) zu senken.

Comisarow und Marshall wandten 1974 erstmals das Verfahren der Fourier-Transformation auf die ICR-MS an [96] und verwendeten dazu einen zuvor von Cooley entwickelten Algorithmus, der eine besonders schnelle Berechnung der Fourier-Transformierten einer diskreten Funktion erlaubt und der unter dem Namen *Fast Fourier Transformation* (FFT) bekannt geworden ist [97]. Die Anregung der Ionen erfolgt mit einem breitbandigen Signal, welches theoretisch ein einfacher Rechteckimpuls sein kann (*Impulse Excitation*). In der Praxis verwendet man komplexere Anregungsimpulse, in denen man kontinuierlich oder schrittweise die Frequenz erhöht (*Swift Excitation*, *Sweep Excitation*) und die es darum ermöglichen, den Massenbereich der angeregten Ionen zu begrenzen oder bestimmte Massenbereiche auszublenden, um die Anzahl der Ionen in der Zelle zu verringern sowie Fragmentierungsexperimente durchzuführen [98-100]. Nach erfolgter Anregung wird das, durch die kohärenten Ionenpakete in die Empfangselektroden der Analysatorzelle, induzierte Signal über einen Verstärker und einen hochauflösenden, schnellen AD-Wandler unter Einhaltung des Nyquist-Kriteriums abgetastet und aufgezeichnet. Die anteiligen Frequenzen des aufgezeichneten Transienten werden durch FFT bestimmt (vgl. Abbildung 2.9) [101]. Die bestimmten Frequenzen werden anschließend mithilfe einer Kalibrierungsgleichung, vorwiegend ein Polynom ersten, zweiten oder höheren Grades, in die korrespondierenden Massen-Ladungsverhältnisse umgerechnet.

$$\frac{m}{z} = C_0 + \frac{C_1}{\omega} + \frac{C_2}{\omega^2} \quad (2.1)$$

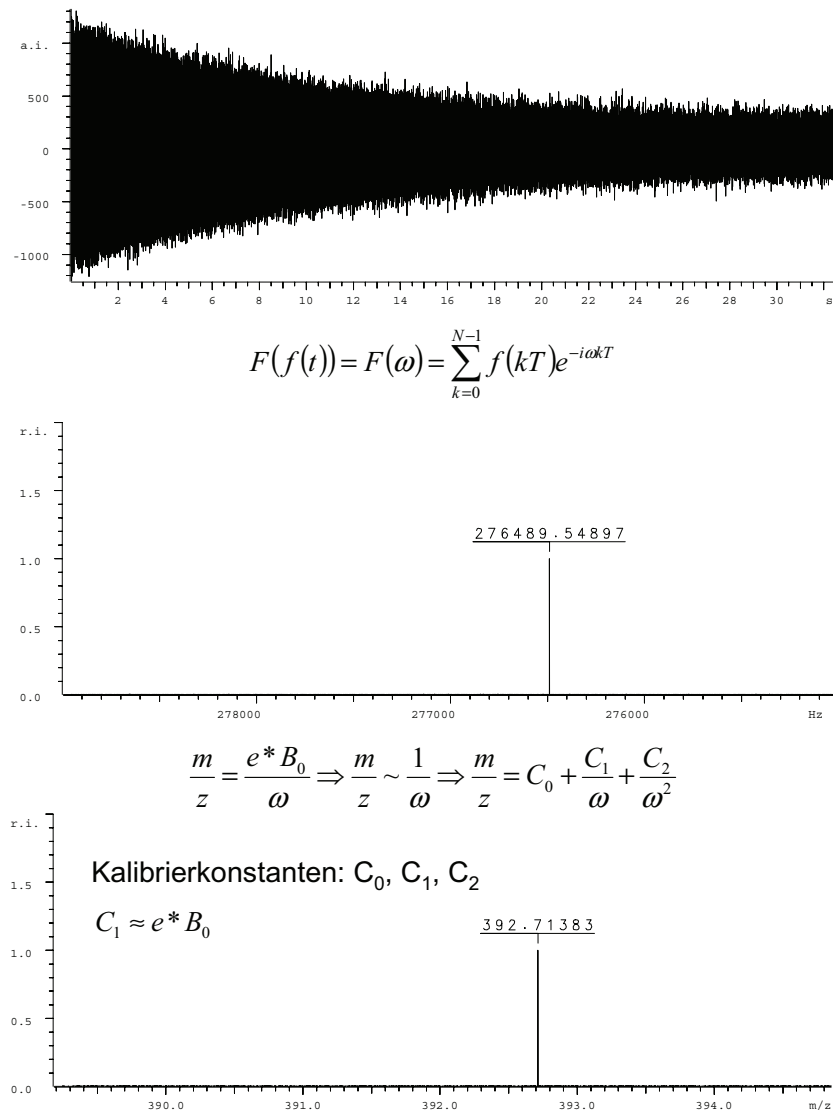


Abbildung 2.9: Detektierter Transient (oben), fouriertransformiertes Signal (mitte) und resultierendes Massenspektrum (unten)

C_0 - C_2 sind die Kalibrierkonstanten, wobei C_0 einen Massen-Offset repräsentiert, C_1 entspricht wegen der Proportionalität $\frac{m}{z} \sim \frac{1}{\omega}$ dem Proportionalitätsfaktor, der sich aus der Zyklotrongleichung zu $C_1 \approx e \cdot B_0$ ergibt und C_2 stellt eine Korrektur der Frequenz dar, die den Einfluss der durch Raumladungseffekte und das elektrostatische Fangpotenzial induzierten Bewegungen auf die Zyklotronfrequenz minimiert [102, 103].

Die Fourier-Transformation wird auch bei anderen spektroskopischen Methoden wie *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (NMR) und *Infrared Spectroscopy* (IR) eingesetzt. NMR und FTICR-MS sind ähnliche Technologien, die viele

Gemeinsamkeiten im Hinblick auf das Gerätedesign, die Messwerterfassung und die Datenauswertung aufweisen [104].

Für weiterführende Informationen über die FTICR-MS sei an dieser Stelle auf den umfangreichen Artikel „*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer*“ von Marshall [93] und eine Reihe weiterer Publikationen verwiesen [102, 105-108].

Die Vorteile eines FTICR-MS liegen in einer unübertroffenen Massenauflösung und Massengenauigkeit über einen großen Massenbereich. Ionen des Wassers konnten z.B. mit einer Auflösung von $400 \cdot 10^6$ und He^+ -Ionen mit einer Auflösung von $200 \cdot 10^6$ gemessen werden [102]. Auch in hohen Massenbereichen wurden Auflösungen demonstriert, welche die isotopische Feinstruktur eines Proteins hinreichend darstellten, um die Anzahl der enthaltenen Schwefelatome zu bestimmen [109], oder komplexe Gemische mit mehreren 1.000 Verbindungen zu analysieren [9-14]. Im Zusammenhang mit Ionen gleicher nomineller Masse (isobare Ionen), die in Gemischen gehäuft auftreten, ist eine hohe Auflösung notwendige Voraussetzung für eine exakte Massenbestimmung. Auflösungen von 100.000 - 200.000 und Massengenauigkeiten von 1-2 ppm (mit externer Kalibrierung) können im Routinebetrieb erreicht werden.

Der hohe instrumentelle Aufwand und die damit verbundenen hohen Kosten stellen einen signifikanten Nachteil der FTICR-MS dar. Da sich viele Parameter wie Auflösung, erfassbarer Massenbereich und Messdauer mit steigender Flussdichte B des Magnetfeldes positiv verändern [110], werden vor allem supraleitende Magneten mit hohen Flussdichten (3 T, 7 T, 9,4 T, 11 T) eingesetzt, um das homogene Feld zu erzeugen, in dem sich die Messzelle befindet. Diese müssen durch kryogene Flüssigkeiten (flüssiges He und N_2) auf eine Betriebstemperatur von knapp 1,7 K heruntergekühlt werden, womit ein hoher Wartungsaufwand verbunden ist. Außerdem erfordert das Zyklotronprinzip ein sehr hohes Vakuum in der Messzelle, da hier die mittlere freie Weglänge für ein Ion im Vergleich zu allen anderen Gerätetypen (1 – 2 m) um ein Vielfaches höher sein muss (10 km und mehr). Um die notwendigen Drücke von weniger als 10^9 mbar zu erzeugen, sind mehrere leistungsfähige Turbomolekularpumpen erforderlich.

3. Methoden zur Auswertung hochaufgelöster und ultrahochaufgelöster Massenspektren

Die computergestützte Auswertung von Massenspektren basiert heute überwiegend auf dem Vergleich eines experimentellen Spektrums mit Referenzspektren aus Spektrenbibliotheken [111]. Diese Bibliotheken enthalten weitestgehend niedrig aufgelöste EI-Vergleichsspektren bekannter Substanzen, die mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen wurden, um eine Reproduzierbarkeit der Fragmentierungsmuster zu gewährleisten [112-118]. Obwohl die Zahl der Einträge in den verschiedenen Bibliotheken stetig ansteigt, kann schon allein aufgrund der enormen Anzahl möglicher chemischer Verbindungen immer nur ein begrenzter Ausschnitt aus dieser Vielfalt erfasst werden⁷. Neben den Referenzspektren enthalten die Datenbanken eine Reihe weiterer, mit den Spektren verknüpfter Informationen. Unter anderem wird die Struktur der Referenzsubstanz zu jedem Referenzspektrum gespeichert, wodurch eine strukturelle Interpretation experimenteller Massenspektren ermöglicht wird. Es gibt erste Ansätze, Datenbanken für kollisionsinduzierte Fragmentierungsmethoden aufzubauen, welche auch bei den weichen Ionisierungstechniken verwendet werden können. Allerdings ist die Reproduzierbarkeit der Fragmentierungsmuster in Massenspektrometern unterschiedlicher Bauart aufgrund der schwierigen Übertragbarkeit angegebener Messparameter nur durch langwierige Tuning-Prozeduren zu erreichen und ein Vergleich mit den Referenzspektren führt häufig nur mit einer großen Toleranz und damit mit geringer Selektivität zum gewünschten Ergebnis [119-121]. Aus diesem Grund beschränkt sich die bibliotheksgestützte Auswertung von Massenspektren zum größten Teil auf EI/CI-Spektren mit nomineller Massenauflösung. Zur Bewertung der Übereinstimmung zwischen experimentellem Spektrum und den Referenzspektren werden eine Reihe verschiedener Vergleichsverfahren eingesetzt, um das korrekte Referenzspektrum und damit die untersuchte Substanz zu bestimmen. Hier sollen das PBM-Verfahren (*Probability Based Matching*) [122, 123], das SISCOM-Verfahren (*Similarity by using a Specific type of Coding and Multiple matching factor assessment*) [124, 125] und das STIRS-Verfahren (*Self training*

⁷ Die "NIST/EPA/NIH Mass Spectral Data Base", Ausgabe 2005, hat 163198 Einträge (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>), die "Wiley Registry of Mass Spectral Data 8th-Edition Library" beinhaltet ca. 390000 Einträge (<http://www.wileyregistry.com>).

Interpretive Retrival System) [126-130] angeführt werden. Das PBM⁸-Verfahren ermittelt dasjenige Referenzspektrum einer Bibliothek, welches am besten mit dem experimentellen Spektrum übereinstimmt. Existiert für die untersuchte Substanz kein Referenzspektrum in der Bibliothek, dann ist eine korrekte Interpretation nicht möglich. Die Verfahren STIRS und SISCOS⁹ sind auch beim Fehlen des korrekten Referenzspektrums in der Lage, Spektren mit ähnlichen Fragmentierungsmustern anzugeben, die Rückschlüsse auf die Struktur einer unbekannten Substanz zulassen. Des Weiteren weisen diese Vergleichsverfahren eine größere Toleranz gegenüber Verunreinigen der untersuchten Verbindung auf. Mit jedem Suchverfahren ist allerdings für eine eindeutige Identifizierung ein Referenzspektrum in der Substanzbibliothek erforderlich. Die bibliotheksgestützte Interpretation von Massenspektren eignet sich besonders für GC/MS-Systeme, die zur Kopplung eines Gaschromatographen an ein Massenspektrometer eine EI/CI-Quelle enthalten und eine große Menge mit dieser Interpretationsmethode kompatibler massenspektrometrischer Daten erzeugen [128, 131, 132].

Die Entwicklung auf dem Gebiet der massenspektrometrischen Analytik der letzten drei bis vier Dekaden ist neben einer zunehmenden Automatisierung vor allem durch eine Steigerung der Massenauflösung und damit einhergehend durch eine erhöhte Genauigkeit bei der Massenbestimmung gekennzeichnet. Die Bestimmung der Massenauflösung erfolgt über das Verhältnis der Masse eines Peaks m zur Breite des Peaks Δm_z bei der relativen Peakhöhe z (siehe Abbildung 3.1). Wenn die Peakbreite $\Delta m_{50\%}$ bei halber Peakhöhe bestimmt wird, spricht man vom „*Full Width at Half Maximum*“ (FWHM) Kriterium. Alle in dieser Arbeit angegebenen Auflösungen sind nach diesem Kriterium bestimmt worden.

⁸ Das PBM Verfahren wird in der Such - und Auswertesoftware AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System*) des NIST (*National Institute of Standards and Technology*) für die Suche in der NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Data Base* angewandt (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/overview.html>).

⁹ Das SISCOS Suchverfahren wird u.a. in der kommerziellen Auswertesoftware MassLib™ verwendet, welche eine Suche in allen größeren Spektrendatenbanken erlaubt (<http://www.masslib.com>).

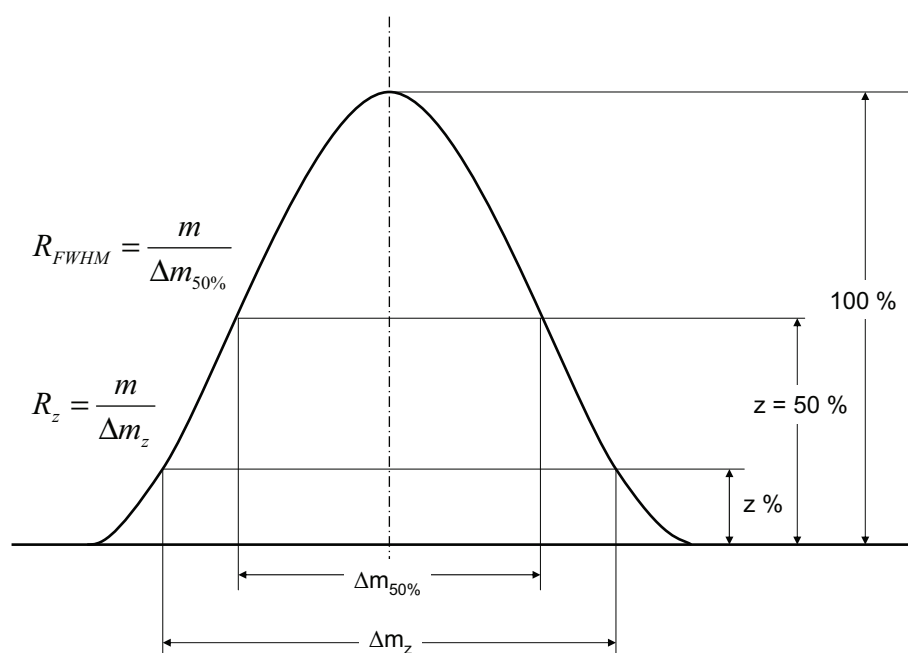


Abbildung 3.1: Definition der Massenauflösung über die Peakbreite. „Full Width at Half Maximum“ FWHM-Kriterium.

Die exakte Massenbestimmung über große Massenbereiche für einzelne Verbindungen und komplexe Gemische gehören heute zu Routine. Die Bestimmung von hochgenauen Ionenmassen und die getrennte Darstellung von Ionen mit ähnlicher Masse stellen neue Informationsquellen in Massenspektren dar, welche bei der bibliotheksgestützten Interpretation von Massenspektren nicht berücksichtigt werden. Auch die neuen, weichen Ionisierungsmethoden wie *Electrospray Ionization* (ESI), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) und *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization* (MALDI), welche die Elektronenstoßionisation aufgrund ihrer größeren Anwendungsbereiche mit Ausnahme in GC/MS-Kopplungen abgelöst haben, sind diesem Auswerteverfahren nicht zugänglich.

Die in den folgenden Kapiteln vorgestellten Methoden sind speziell für die Auswertung hoch- und ultrahochaufgelöster Massenspektren geeignet und unabhängig von der eingesetzten Ionisierungsmethode.

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen MS-Typen und deren typische Auflösungsbereiche.

Tabelle 3.1: Auflösungen verschiedener Massenanalysatoren

Gerätetyp	Auflösung	Einteilung ^a
Quadrupol-MS	bis 1000	einheits- oder niedrigauflösend
Single Stage TOF-MS	800 – 1000	einheits- oder niedrigauflösend
Einfachfokussierende Sektorfeld-MS	1000 – 2000	einheits- oder niedrigauflösend
Reflektor TOF-MS	10000 – 25000	hochauflösend
Doppelfokussierende Sektorfeld-MS	10000 – 150000	hoch- und ultrahochauflösend
FTICR-MS	100000 – $< 10^7$	ultrahochauflösend

a) Es gibt in der Literatur keine explizite Definition für die hier vorgenommene Einteilung. Unter niedrigauflösend wird in dieser Arbeit eine Auflösung verstanden, die ausreicht, um einfachgeladene Ionen mit einem Massenunterschied von ca. 1 Da, also einer unterschiedlichen nominellen Masse, getrennt abzubilden. Hochauflösung zeichnet sich dadurch aus, dass Ionen eines Gemisches mit gleicher nomineller Masse unterschieden werden können, wenn deren Massenunterschied ausreichend groß ist. Unter ultrahoher Auflösung ist eine Auflösung zu verstehen, die es ermöglicht, isobare Isotopenkonfigurationen einer Verbindung, die so genannten Dubletts, getrennt darzustellen, die sich nur durch einen sehr geringen Massenunterschied von einigen mDa unterscheiden. Aufgrund dieser Eigenschaft sind ultrahochauflösende Massenspektrometer auch für die Analyse komplexer Gemische geeignet, da sie in der Lage sind, sämtliche auftretende Ionen getrennt darzustellen und die in hoch- und niedrigauflösenden Massenspektrometern auftretende Überlagerung von Ionen unterschiedlicher Herkunft, welche eine Interpretation erschwert oder ohne vorhergehende chromatographische Trennung vielfach unmöglich macht, zu vermeiden.

Ausgangspunkt für die Auswertung ist die kombinatorische Zuordnung aller möglichen Elementarkombinationen (EK) zu einer genau bestimmten Ionenmasse, die in Kapitel 3.1 erläutert wird. In Abschnitt 3.2 werden anschließend verschiedene Verfahren zur Simulation des Isotopenmusters einer EK beschrieben. Die Auswertung des spektralen Isotopenmusters kann, neben einer Reihe anderer in Kapitel 3.3 ausgeführter Kriterien, zur Reduktion der kombinatorisch ermittelten Anzahl der EK beitragen. Die Auswertung kompletter Massenspektren durch Ausnutzung allgemeingültiger Beziehungen zwischen Molekül- und Fragmentionen ist Inhalt von Kapitel 3.4. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Reihenfolge der Anwendung der dargestellten Algorithmen zur Auswertung hoch- und ultrahochauflöster Massenspektren. Diese beginnt mit der kombinatorischen Zuordnung von EK zu allen Peaks eines Massenspektrums unter Berücksichtigung der exakten Masse und weiterer Kriterien, die die Lösungsmenge einschränken. Im nächsten Schritt wird für jede EK das Isotopenmuster simuliert und mit dem experimentellen Muster verglichen. Dadurch können weitere EK, deren Muster

signifikant vom spektralen Muster abweicht, ausgeschlossen werden. Im dritten Schritt wird die notwendige Konsistenz von Molekülionen mit zugeordneten Fragmentationen überprüft. In Folge dessen kann einerseits die Lösungsmenge weiter reduziert werden und andererseits lassen sich Rückschlüsse auf mögliche Fragmentierungspfade ziehen, die bei der strukturellen Interpretation eines Massenspektrums von Nutzen sind.

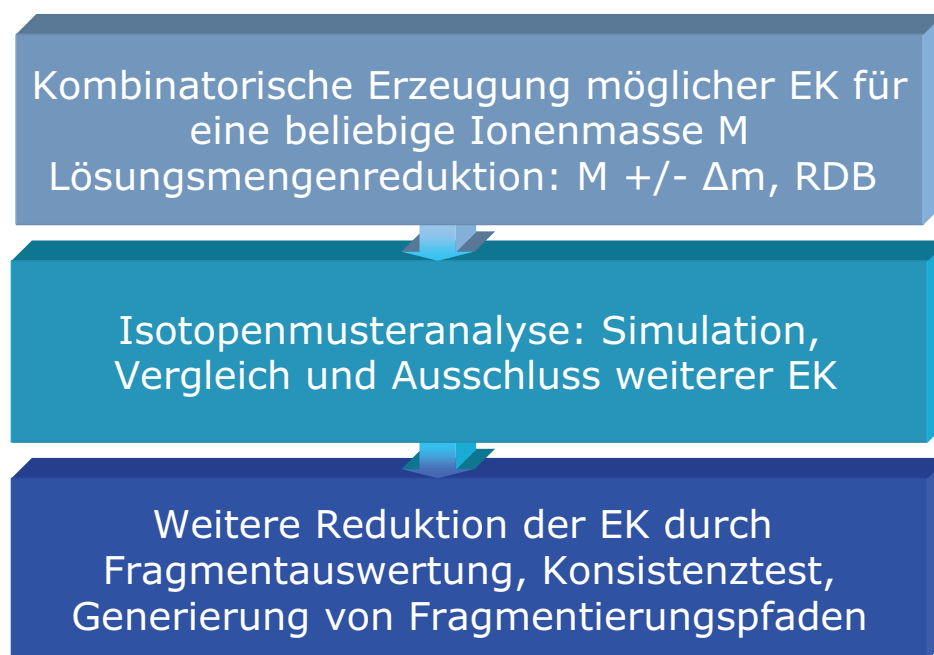


Abbildung 3.2: Reihenfolge der eingesetzten Auswertealgorithmen

Unmittelbare Voraussetzung für die Anwendung dieser Methodik ist die Möglichkeit der exakten Massenbestimmung. Diese erfordert, dass zumindest alle monoisotopischen Peaks interferenzfrei, d.h. ohne von Peaks anderer Ionen überlagert zu werden, abgebildet werden können. Eine hinreichend hohe Auflösung ist dafür nur mittelbare Voraussetzung. Solange gewährleistet wird, dass sich keine Peaks unterschiedlicher Verbindungen überlagern, ist eine exakte Massenbestimmung auch mit hoch- und sogar mit niedrigauflösenden Massenspektrometern möglich [133]. Für die Untersuchung von komplexen Stoffgemischen, bei denen eine Überlagerung von Peaks wahrscheinlich ist, muss entweder auf den Einsatz ultrahochauflösender Massenspektrometrie oder die Kopplung mit chromatographischen Trennverfahren (GC/MS, LC/MS, CE/MS) zurückgegriffen werden.

3.1. Summenformelbestimmung - Elementaranalyse

Die Bindungsenergie pro Nukleon im Atomkern und der damit verbundene Massendefekt sind für jedes chemische Element bzw. für jedes Isotop eines Elementes unterschiedlich. Deshalb hat jedes Element eine exakte Masse, deren Wert von der nominellen (ganzzahligen) Masse bzw. der Nukleonenzahl abweicht. Daraus resultierend hat auch jede beliebige Kombination von Elementen eine einmalige exakte¹⁰ Masse. Die exakte Masse ist eine physikalische Eigenschaft chemischer Verbindungen, die eindeutig auf die Elementarkombination derselben schließen lässt. Theoretisch lässt sich zu jeder Verbindung eine eindeutige Elementarkombination bestimmen, wenn die Masse hinreichend genau ermittelt werden kann. Der Zusammenhang zwischen exakter Masse und zugehöriger Elementarkombination wurde schon in der Anfangszeit der Massenspektrometrie zur Identifizierung unbekannter Verbindungen genutzt und stellt heute, unterstützt durch die breite Verfügbarkeit hochauflösender und genauer Massenspektrometer, einen wesentlichen Angriffspunkt bei der Interpretation von Massenspektren dar [4, 8, 10, 12, 13, 134-138]. Während die Intensität eines Ions in Massenspektrometern nur mit einer Präzision von einigen Prozent bestimmt werden kann, ist die Masse eines Ions mit hoher Präzision und einer hohen relativen Genauigkeit¹¹ von einigen ppm detektierbar.

Die exakte Masse¹² einer Verbindung kann leicht aus der Summenformel bestimmt werden ($M = \sum_i M_i n_i$, M_i Masse des i-ten Elements, n_i Index des i-ten Elements),

aber es gibt umgekehrt keine Berechnungsmethode, die zu einer gegebenen Masse die korrespondierende Summenformel liefert. In den folgenden Abschnitten soll ein Verfahren zur Bestimmung der Summenformel(n) zu einer massenspektrometrisch bestimmten Masse dargestellt werden. Weil es sich bei den Massen um gemessene Werte handelt, muss zusätzlich zur Masse auch die Fehlertoleranz bei der Massenbestimmung $\pm \Delta m$ berücksichtigt werden. In den folgenden Abschnitten wird immer von einfachgeladenen Ionen ausgegangen ($z = 1$), so dass das mit einem

¹⁰ Sofern nicht anders ausgeführt, wird unter exakter Masse immer die monoisotopische Masse verstanden.

¹¹ $\Delta m_{\text{ppm}} = (m_{\text{gemessen}} - m_{\text{theoretisch}}) / m_{\text{theoretisch}} * 10^6$

¹² Zur Definition der exakten Massenbestimmung siehe Kapitel 3.3.1.

Massenspektrometer ermittelte Masse-Ladungsverhältnis m/z mit der Ionenmasse gleichgesetzt und in der Einheit Da angegeben werden kann.

3.1.1. Kombinationsmethode

Die Zuordnung aller gültigen Elementarkombinationen zu einer Masse kann nur auf kombinatorischem Wege erfolgen. Dazu müssen alle möglichen Kombinationen der Indizes einer Elementarkombination bestimmt werden (z.B. $n_C n_H n_N n_O$), die folgende Bedingung erfüllen:

$$M - \Delta m < \sum_i M_i n_i < M + \Delta m \quad (3.1)$$

Dabei ist Δm die absolute Massentoleranz, M die Zielmasse und M_i die Masse des i -ten Elementes.

Vor der allgemeinen Verfügbarkeit leistungsfähiger Computer wurde für die Zuordnung von Summenformeln zu einer Masse auf "Lookup Tables" zurückgegriffen, die alle möglichen, nach der Masse geordneten, Kombinationen verschiedener Elemente, zumeist C, H, N und O, enthalten [139]. Die maximale Anzahl der K Möglichkeiten, i verschiedene Elemente bis zu einer Masse M zu kombinieren, kann mit $K = \prod_i \left\lfloor \frac{M}{M_i} \right\rfloor$ abgeschätzt werden [140]. Der Term M/M_i gibt

die maximale Anzahl eines Elements i in einer Verbindung mit der Masse M an. Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich wird, steigt die Anzahl der Kombinationen mit zunehmender Masse und steigender Anzahl an Elementen exponentiell an. Die einfache kombinatorische Generation und Überprüfung aller möglichen Elementarkombinationen nach Gleichung (3.1) erscheint deshalb in dieser Form, vor allem mit ansteigender Masse und zunehmender Anzahl der zu kombinierenden Elemente, nicht geeignet, alle EK im Toleranzfenster $\pm \Delta m$ zu bestimmen.

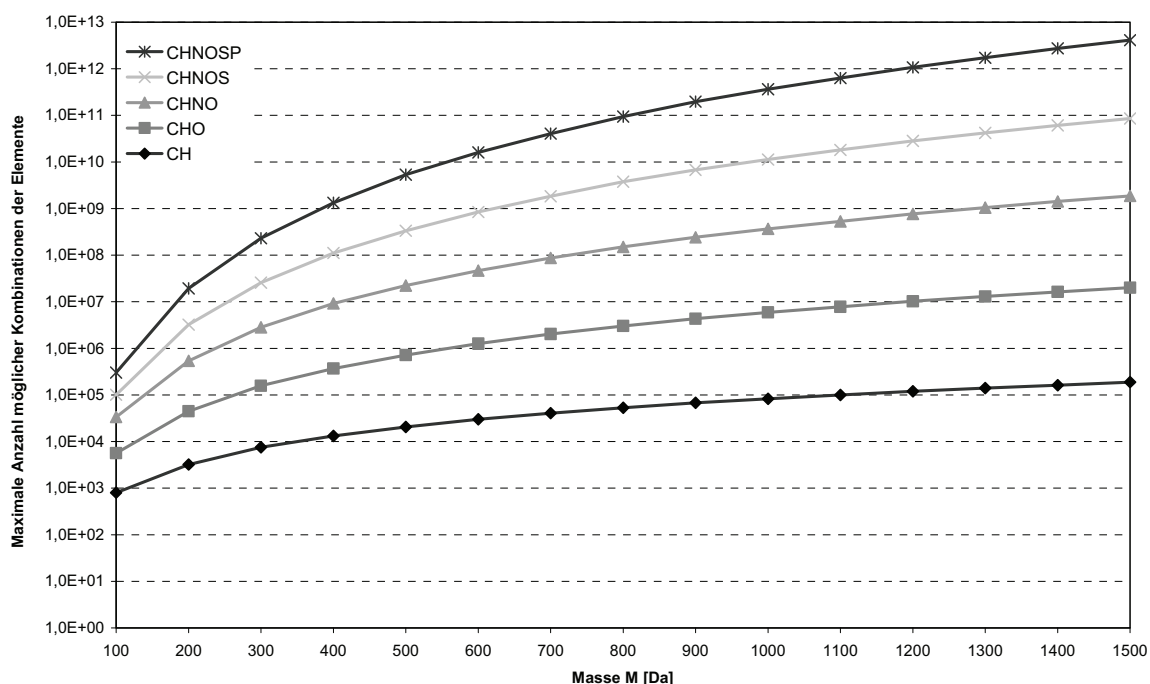


Abbildung 3.3: Darstellung des exponentiellen Anstiegs der Anzahl möglicher Elementarkombinationen mit steigender Masse für eine Auswahl verschiedener Elemente.

Die exponentielle Komplexität dieses kombinatorischen Problems kann zwar nicht umgangen werden, aber es gibt dennoch einige Möglichkeiten, den Rechenaufwand zu verringern.

3.1.2. Ergänzung von Wasserstoff

Der erste Ansatz besteht darin, das in organischen Verbindungen nahezu immer enthaltene Element Wasserstoff vom Kombinationsvorgang auszuschließen und erst im Anschluss zur Masse jeder gebildeten Kombination entsprechend der Zielmasse M zu ergänzen. Betrachtet man die am häufigsten in organischen Verbindungen enthaltenden Elemente C, H, N und O, so wird nur mit den Elementen C, N und O kombiniert. Zu jeder Kombination dieser drei Elemente, deren Masse M_k kleiner als die Zielmasse M ist, werden nach Gleichung (3.2) so viele Wasserstoffatome hinzugefügt, dass die nominelle Masse der Kombination mit der nominellen Zielmasse übereinstimmt [141].

$$n_H = \left\lfloor \frac{M - M_k}{M_H} + 0,5 \right\rfloor \quad (3.2)$$

(M: Zielmasse, M_k : Masse der Kombination der Elemente C, N, O, usw., M_H : Masse von Wasserstoff)

Die Anzahl der benötigten Kombinationsschritte reduziert sich dadurch ca. um den Faktor $M / M_H \approx M$.

Abbruch bei Überlauf

Ein weiterer Effekt der rechnerischen Ergänzung von Wasserstoff ist, dass keine Elementarkombinationen gebildet werden, deren Masse kleiner als die nominelle Zielmasse ist. Durch eine geeignete Vorgehensweise beim Kombinieren lässt sich auch verhindern, dass Kombinationen erzeugt werden, deren nominelle Massen größer als die Zielmasse sind. Stellt man sich die Bildung der Kombinationen wie das Hochzählen einer Zahl vor, indem die Indizes der Elemente sukzessive inkrementiert werden, dann wird ein Überlauf erzeugt, wenn die Masse M_k der ohne Wasserstoff erzeugten Kombination größer wird als die gesuchte Masse M. In diesem Fall wird der im vorherigen Durchlauf inkrementierte Index auf den Minimalwert zurückgesetzt (im Beispiel aus Tabelle 3.2 ist das Null, im Allgemeinen aber ein frei definierbarer Wert) und der nächste höherwertige Index um Eins erhöht. Sobald der Index mit der höchsten Wertigkeit überläuft, wurden alle möglichen Elementarkombinationen gebildet und die Berechnung kann beendet werden.

Tabelle 3.2: Kombination für die Masse M = 181,04954 Da, Acetylsalicylsäure ($C_9H_8O_4 + H$)⁺

Kombination	n_O Sauerstoff	n_N Stickstoff	n_C Kohlenstoff	Masse M_k^a	Operationen ^b
$O_0N_0C_0$	0	0	0	0	$n_C+1, n_H=180$
$O_0N_0C_1$	0	0	1	12	$n_C+1, n_H=167$
$O_0N_0C_2$	0	0	2	24	$n_C+1, n_H=156$
...
$O_0N_0C_{15}$	0	0	$\text{int}(M/M_C)=15$	180	$n_C+1, n_H=1$
$O_0N_0C_{16}$	0	0	16	192	Überlauf, $n_C=0, n_N+1$
$O_0N_1C_0$	0	1	0	14	$n_C+1, n_H=166$
$O_0N_1C_1$	0	1	1	26	$n_C+1, n_H=154$
...
$O_0N_{12}C_0$	0	$\text{int}(M/M_N)=12$	0	168	$n_C+1, n_H=13$
$O_0N_{12}C_1$	0	12	1	180	$n_C+1, n_H=1$
$O_0N_{12}C_2$	0	12	2	192	Überlauf, $n_C=0, n_N+1$
$O_0N_{13}C_0$	0	13	0	182	Überlauf, $n_N=0, n_O+1$

Kombination	n_O Sauerstoff	n_N Stickstoff	n_C Kohlenstoff	Masse M_k^a	Operationen ^b
$O_1N_0C_0$	1	0	0	16	$n_C+1, n_H=164$
$O_1N_0C_1$	1	0	1	28	$n_C+1, n_H=152$
...
$O_{11}N_0C_0$	$\text{int}(M/M_O)=11$	0	0	176	$n_C+1, n_H=5$
$O_{11}N_0C_1$	11	0	1	188	Überlauf, $n_C=0, n_N+1$
$O_{11}N_1C_0$	11	1	0	190	Überlauf, $n_N=0, n_O+1$
$O_{12}N_0C_0$	12	0	0	192	Überlauf bei n_O , Ende

a) M_k ist für die Darstellung auf die nächstliegende ganze Zahl gerundet.

b) n_H wird mit Gleichung (3.2) bestimmt.

Ordnet man die zu kombinierenden Elemente nach ihrer Masse und setzt das schwerste Element an die höchstwertige Position (links), dann werden die Anzahl der Überläufe und damit die Gesamtanzahl an Inkrementierungsschritten minimiert [142]. Jeder Inkrementierungsschritt, mit Ausnahme der Schritte, die einen Überlauf verursachen, erzeugt eine gültige Elementarkombination. Für jede gebildete Elementarkombination muss die exakte Masse M_k bestimmt werden, um einen Überlauf festzustellen und um die notwendige Anzahl an Wasserstoffatomen zu berechnen. Aus Effizienzgründen ist es nicht sinnvoll, die exakte Masse der EK in jedem Schritt explizit aus den Indizes der EK nach Gleichung (3.1) zu berechnen, sondern die Masse durch Addition der Masse des inkrementierten Elements mit der Masse der vorherigen Kombination zu bestimmen. Im Fall eines Überlaufs muss die Masse des zurückzusetzenden Elements mit dessen Index multipliziert werden, von der Masse der vorhergehenden Kombination abgezogen werden und zusätzlich die Masse des inkrementierten Elements addiert werden. Dadurch kann die Anzahl der benötigten Rechenoperation zur Bestimmung von M_k in den meisten Fällen¹³ auf eine Addition reduziert werden.

Diese Vorgehensweise ist auch dann anwendbar, wenn nicht mit Wasserstoff kombiniert wird. In diesem Fall entfällt die Ergänzung von Wasserstoff.

¹³ Davon ausgenommen sind die Überläufe.

3.1.3. Berechnung des Anteils von Kohlenstoff und Wasserstoff in einer EK

Neben dem Element Wasserstoff lässt sich auch das Kohlenstoffisotop ^{12}C aus dem Kombinationsprozess ausschließen. Die Möglichkeit der rechnerischen Ergänzung der Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff zu einer Kombination von Heteroatomen¹⁴ beruht auf der Tatsache, dass das ^{12}C Isotop von Kohlenstoff, resultierend aus der Definition der Masseneinheit, eine exakte Masse von 12.0 Da hat¹⁵ und demzufolge der Massendefekt, die Abweichung der exakten Masse von der nominellen Masse, Null ist [142].

Betrachtet man das Beispiel Acetylsalicylsäure $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ aus Tabelle 3.2, dann ergibt sich folgende Problemstellung für die Heteroatomkombination O_4 . Die exakte Masse der Kombination O_4 berechnet sich nach der Gleichung

$$M_k = \sum_i M_i n_i \quad (3.3)$$

zu 63,97966 Da. Die Masse des Moleküls M^+ sei mit 180,04171 Da und mit einer Genauigkeit von $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 3$ ppm bzw. $\Delta m = \pm 0,54$ mDa bestimmt worden. Da die weiteren Berechnungen mit neutralen Molekülen erfolgen, wird dem Ladungszustand entsprechend eine Elektronenmasse zur gemessenen Masse M addiert bzw. von M subtrahiert. Im Fall eines positiv geladenen Ions fehlt eine negative Ladung und es wird eine Elektronenmasse m_e ¹⁶ addiert.

$$M^* = M^{+/-} + /- m_e \quad (3.4)$$

Man erhält für das Molekülion eine korrigierte Masse M^* von 180,04226 Da. Weil das Kohlenstoffisotop ^{12}C einen Massendefekt von Null hat, kann die Differenz zwischen den Massendefekten des Moleküls D und der Heteroatomkombination D_k nur durch den Massendefekt von Wasserstoff D_H verursacht werden. Unter Berücksichtigung der Toleranz bei der Massenbestimmung ergeben sich für die gemessenen Masse ein minimaler und ein maximaler Massendefekt:

¹⁴ Alle Elemente außer Kohlenstoff und Wasserstoff.

¹⁵ Definition der Masseneinheit: $1 \text{ Da} = 1/12 M(^{12}\text{C}_1) = 1,6605402 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

¹⁶ Elektronenmasse $m_e = 0,00054858 \text{ Da}$

$$D_{\max/\min} = M^* - \lfloor M^* \rfloor + /- \Delta m \quad (3.5)$$

von $D_{\max} = 0,0428$ Da und $D_{\min} = 0,0417$ Da. Der Defekt der gebildeten Kombination D_k berechnet sich äquivalent nach:

$$D_K = M_k - \lfloor M_k \rfloor \quad (3.6)$$

zu $D_k = 0,97966$ Da. Für den Fall das D_{\max} kleiner als D_k ist, wird eine Masseneinheit zu D_{\max} und D_{\min} addiert, um zu berücksichtigen, dass der von Wasserstoff verursachte Massendefekt immer positiv ist¹⁷.

$$D_{\max/\min}^* = D_{\max/\min} + 1 \quad (3.7)$$

Damit ergibt sich für das Beispiel D_{\max}^* zu 1,0428 Da und D_{\min}^* zu 1.0417 Da. Die nun bestimmbare Differenz der Massendefekte zwischen Heterokombination und Zielmasse

$$D_{D\max/\min} = D_{\max/\min}^* - D_k \quad 0 \leq D_{D\max/\min} \leq 1 \quad (3.8)$$

$D_{D\max} = 0,06314$ Da und $D_{D\min} = 0,06204$ Da korrespondiert mit der minimal und maximal möglichen Anzahl der Wasserstoffatome, die sich nach folgender Gleichung

$$n_{H\max/\min}^* = \frac{D_{D\max/\min}}{D_H} \quad (3.9)$$

zu $n_{H\max}^* = 8,069$ und $n_{H\min}^* = 7,928$ berechnen lässt. Der nach der Bestimmung des Wasserstoffanteils verbleibende Massenanteil muss dann entsprechend nachfolgender Gleichung mit Kohlenstoff aufgefüllt werden.

¹⁷ $D_H = M_H - \lfloor M_H \rfloor = 0,007825$ Da

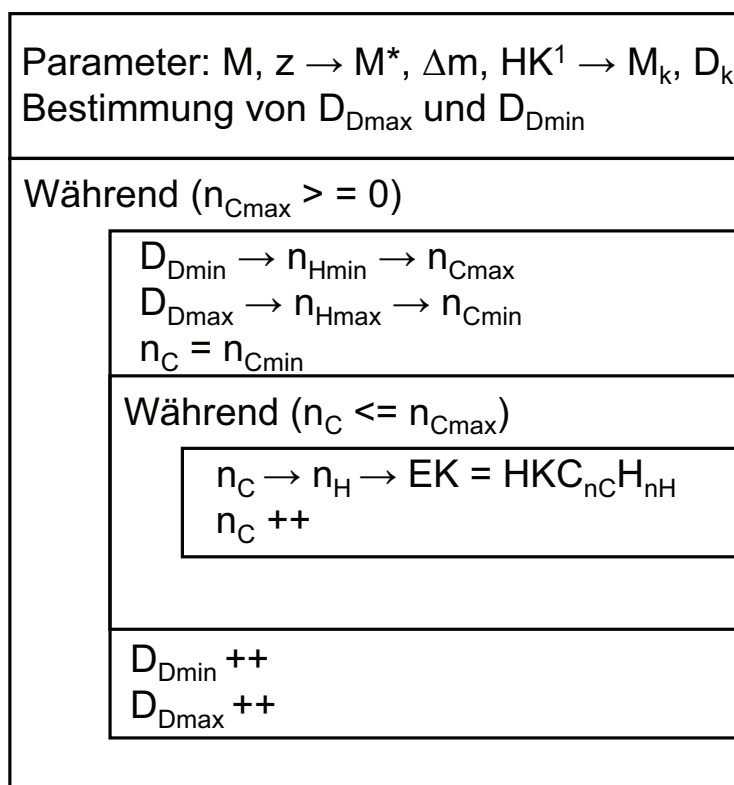
$$n_{C \max} = \left\lfloor \frac{M^* - M_k - n_{H \min}^* \cdot M_H}{M_C} \right\rfloor \quad n_{C \min} = \left\lceil \frac{M^* - M_k - n_{H \max}^* \cdot M_H}{M_C} \right\rceil \quad n_{C \max} \geq 0 \quad (3.10)$$

Für das betrachtete Beispiel können auf diese Weise neun Kohlenstoffatome bestimmt werden $n_{C \max} = n_{C \min} = 9$. Der Wasserstoffanteil wird anschließend durch „Auffüllen“ des verbleibenden Massenanteils (wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben) mit Wasserstoff bestimmt, wobei aufgrund der erforderlichen Rundungen bei der Bestimmung des Kohlenstoffanteils auf ganzzahlige Werte die Anzahl nicht mit den in Gleichung (3.9) bestimmten Werten von $n_{H \max}^*$ und $n_{H \min}^*$ übereinstimmen müssen:

$$n_{H \max/\min} = \left\lceil \frac{M^* - M_k - n_{C \min/\max} \cdot M_C}{M_H} + 0,5 \right\rceil \quad (3.11)$$

Im betrachteten Beispiel wird nur eine mögliche Anzahl von Kohlenstoff und demzufolge nur eine EK (O_4C_9) bestimmt, für die eine Anzahl von $n_H = 8$ Wasserstoffatomen ergänzt wird. Überschreitet die absolute Massengenauigkeit einen Grenzwert, dann ist die Zahl der bestimmten Kohlenstoffatome nicht mehr eindeutig und die Maximal- und Minimalwerte unterschiedlich [143].

Verkleinert man die relative Genauigkeit der Massenbestimmung im dargestellten Beispiel auf 600 ppm, steigt der absolute Fehler auf $\Delta m = 0,108$ Da. Für den von Wasserstoff verursachten Massendefekt ergibt sich dann ein Maximalwert von $D_{D \max} = 0,1706$ Da und ein Minimalwert von $D_{D \min} = -0,0454$ Da. Man berechnet jetzt eine Anzahl von mindestens 8 und maximal 9 Kohlenstoffatomen. Es werden demzufolge zwei Kombinationen O_4C_8 und O_4C_9 gefunden, zu denen anschließend die fehlende Anzahl an Wasserstoffatomen ergänzt werden muss, vgl. Abbildung 3.4 innere Schleife. Die beiden bestimmten EK $H_{20}O_4C_8$ und $H_8O_4C_9$ sind damit gültige Lösungen im Toleranzfenster von 600 ppm.



¹ HK = Beliebige Kombination von Heteroatomen

Abbildung 3.4: Ablaufplan der rechnerischen Ergänzung von Kohlenstoff und Wasserstoff zu einer Kombination von Heteroatomen

Überlauf von Wasserstoff

Mit ansteigender Molekülmasse besteht die Möglichkeit, dass mehr als 127 Wasserstoffatome im Molekül enthalten sind und der durch Wasserstoff verursachte Massendefekt D_D größer als eins wird, vgl. $D_D = 127 \cdot D_H = 0,993775$ Da, $D_D = 128 \cdot D_H = 1,0016$ Da. Die beschriebene Bestimmung von $D_{Dmax/min}$ liefert allerdings immer einen Massendefekt, der kleiner oder gleich 1 ist. Um diesen Überlauf des Massendefekts zu berücksichtigen und alle EK zu bestimmen, muss die Berechnung wiederholt werden, nachdem zu D_{Dmax} und D_{Dmin} jeweils eine Masseneinheit addiert wurde. Die Inkrementierung von $D_{Dmax/min}$ und nachfolgende Berechnung von $n_{Cmax/min}$ wird solange wiederholt, bis n_{Cmax} kleiner als Null wird. Weil der für Kohlenstoff verbleibende Massenanteil mit ansteigender Anzahl der Wasserstoffatome nach jeder Inkrementierung von $D_{Dmax/min}$ kleiner wird, wird auch n_{Cmax} nach einer endlichen Anzahl von Inkrementierungsschritten kleiner als Null. Durch den Ausschluss der zwei Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff vom Kombinationsprozess reduziert sich die Zahl der Kombinationsschritte ca. um den

Faktor $M/M_H * M/M_C$, sofern die Anzahl von Kohlenstoff und Wasserstoff unbeschränkt ist.

Wird ohne Wasserstoff kombiniert, kann der Kohlenstoffanteil nach Gleichung (3.10) bestimmt werden, indem n_H Null gesetzt wird. Erfolgt die Bestimmung der EK ohne Kohlenstoff, genügt es, den Wasserstoffanteil nach Gleichung (3.11) zu bestimmen, indem n_C Null gesetzt wird, was der im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergänzung von Wasserstoff entspricht.

3.1.4. Summenformelbestimmung aus Isotopenmustern in niedrigaufgelösten Massenspektren

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle eine weitere Methode zur Summenformelbestimmung kurz erläutert, die Anwendung finden kann, wenn keine hoch aufgelösten MS-Daten mit exakten Massenwerten zu Verfügung stehen. In diesem Fall kann die EK einer Ionenspezies durch Auswertung ihres Isotopenmusters abgeschätzt werden. Wie in Kapitel 3.2 gezeigt wird, resultiert das Isotopenmuster aus der Art und der Anzahl der in einer Verbindung vorkommenden Elemente und deshalb lassen sich aus dem Isotopenmuster auch Rückschlüsse auf die EK ziehen. Da die Genauigkeit der Intensitätsmessung in Massenspektrometern begrenzt ist, kann mit diesem Verfahren vorwiegend keine eindeutige EK bestimmt werden.

Für die Bestimmung des Brom- und Chloranteils wird das Verhältnis der Intensitäten der M und $(M+2)^{18}$ Ionen ausgewertet, da beide Elemente ein signifikantes $(M+2)$ -Isotop besitzen [144-147]. Für kleine Moleküle $M < 1000$ Da ist der Einfluss der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff auf die Intensität des $(M+2)$ -Peaks eines Isotopenmusters gering und kann für die Bestimmung des Anteils von Chlor und Brom vernachlässigt werden. Durch Auswertung des Intensitätsverhältnisses zwischen M und $(M+1)$ -Peak kann eine Abschätzung des maximal enthaltenen Anteils an Kohlenstoff erfolgen [148].

Im Allgemeinen werden diese Methoden verwendet, um den Anteil bestimmter Elemente nach oben und unten hin einzuschränken und dadurch die kombinatorisch ermittelte Anzahl der EKs zu reduzieren [147, 149-151]. Trotz des eingeschränkten Kombinationsbereiches steigt die Lösungsmenge mit ansteigender Masse rapide an,

¹⁸ M ist die Masse des monoisotopischen Peaks und $(M+2)$ ist der 2 Da schwerere Isotopenpeak eines Ions.

wenn keine exakten Masseninformationen zu Verfügung stehen. Dies begrenzt den Massenbereich für eine sinnvolle Anwendung dieser Methode auf 200-300 Da.

Unter Berücksichtigung der EKs von Fragmentationen in EI-Massenspektren kann der minimale Anteil bestimmter Elemente weiter eingeschränkt werden und damit auch die Lösungsmenge für das Molekülion reduziert werden [152].

3.2. Berechnung theoretischer Isotopenmuster

Das Wort „Isotop“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „gleicher Ort“ (isos = gleich, topos = Ort), womit die Position im Periodensystem und damit ein bestimmtes Element gemeint ist. Grundsätzlich werden radioaktive und stabile Isotope unterschieden.

Die meisten chemischen Elemente kommen in der Natur als Gemisch mehrerer Isotope vor, die sich aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl von Neutronen im Atomkern in ihrer Masse unterscheiden.

Tabelle 3.3: Natürlich vorkommende Isotope der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Chlor und Brom

Element	OZ	MZ	Exakte Masse [Da]	Häufigkeit P [%]
H	1	1	1,00782503	99,988
		2	2,01410178	0,012
C	6	12	12,0	98,93
		13	13,0033548	1,07
N	7	14	14,0030740	99,63
		15	15,0001088	0,37
O	8	16	15,9949146	99,757
		17	16,9991315	0,038
		18	17,9991604	0,205
S	16	32	31,9720707	95,02
		33	32,9714585	0,75
		34	33,9678668	4,21
		36	35,9670809	0,02

Element	OZ	MZ	Exakte Masse [Da]	Häufigkeit P [%]
Cl	17	35	34,9688527	75,529
		37	36,9659026	24,471
Br	35	79	78,9183376	50,79
		91	80,9162910	49,31

Deshalb treten Verbindungen polyisotopischer Elemente im Massenspektrum durch ein Muster mehrerer Peaks in Erscheinung, die sich jeweils um ca. eine Masseneinheit unterscheiden und charakteristische Intensitäten aufweisen. Die relativen Intensitäten der einzelnen Isotopenpeaks werden durch die Art und die Anzahl der beteiligten Elemente bestimmt und lassen somit Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung eines Ions zu.

Die Masse dieses Gemisches, die sich aus dem häufigkeitsgewichteten Mittelwert der Isotopenmassen berechnet, wird als chemische oder molare Masse bezeichnet.

Die chemische Masse des Elementes Sauerstoff berechnet man z.B. zu $m_{O_{ch}} = 0.9976 * m_{^{16}O} + 0.0004 * m_{^{17}O} + 0.002 * m_{^{18}O} = 15.999885 \text{ Da}$.

Unter der exakten Masse versteht man die Masse eines Isotops bzw. einer Verbindung aus Isotopen unter Berücksichtigung des Massendefektes.

Die exakte Masse von Methylbromid ($^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{79}\text{Br}$) ergibt sich aus der Summe der Isotopenmassen zu $m = (1 * 12,000000 + 3 * 1,007825 + 1 * 78,918336) = 93,941011 \text{ Da}$. Die exakte Masse einer Verbindung, die sich aus den leichtesten Isotopen der beteiligten Elemente ergibt, wird auch als monoisotopische Masse bezeichnet. Wenn in dieser Arbeit von der exakten Masse einer Verbindung gesprochen wird, ist darunter immer die monoisotopische Masse zu verstehen. Sollten andere als die leichtesten Isotope bei den angegebenen exakten Massen berücksichtigt worden sein, wird explizit darauf hingewiesen.

Unter der nominellen Masse versteht man den ganzzahligen gerundeten Wert der exakten Masse eines Isotops, welcher der Anzahl der Nukleonen entspricht, bzw. die Summe der nominellen Massen aller Isotope einer Verbindung. Die nominelle Masse von Methylbromid beträgt 94 Da [1].

3.2.1. Mathematische Grundlagen

Sind die Auftretswahrscheinlichkeiten der Isotope aller Elemente bekannt, so ist es möglich, zu einer vorgegebenen Summenformel das korrespondierende Isotopenmuster zu berechnen. In dieser Arbeit wird immer von den natürlichen Auftretswahrscheinlichkeiten der Isotope ausgegangen, die vom „*National Institute of Standards and Technology*“ (NIST) festgelegt wurden [153].

Die Summenformel einer Verbindung, bestehend aus den Elementen A-Z mit der Anzahl a-z, kann in folgender Form verallgemeinert werden:

$$F = \sum_{\substack{E=A \\ e=a}}^{\substack{E=Z \\ e=z}} e * E = A_a B_b C_c \dots Z_z \quad (3.12)$$

Jedes Element besitze eine beliebige Anzahl von n Isotopen ($A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$) mit den Auftretswahrscheinlichkeiten ($P_{A1}, P_{A2}, \dots, P_{An}$), deren Summe für jedes

Element $\sum_{i=1}^n P_{Ai} = 1$ auf Eins normiert wird [154]. Als Isotopenkonfiguration soll in den

folgenden Ausführungen eine definierte Auswahl von e Atomen aus n verschiedenen Isotopen verstanden werden. Die Isotopenkonfigurationen verschiedener Elemente sind unabhängig voneinander und können deshalb getrennt voneinander betrachtet werden. Da es für die Masse eines Ions keine Rolle spielt, an welcher Position im Ion sich die unterschiedlichen Isotope befinden, bleibt die Reihenfolge der Isotope in einer Konfiguration unberücksichtigt. Dies soll am folgenden Beispiel verdeutlicht werden. Eine mögliche Isotopenkonfiguration des Elementes Brom einer Verbindung,

die zehn Brom Atome enthält, ist $^{79}\text{Br}_8 ^{81}\text{Br}_2$. Es gibt nun $\frac{10!}{8!*2!} = 45$ Möglichkeiten, die

acht $^{79}\text{Br}_8$ und die zwei $^{81}\text{Br}_2$ Isotope auf den zehn möglichen Positionen in der Verbindung anzuordnen. Alle diese so genannten Permutationen weisen allerdings die gleiche Masse auf und sind massenspektrometrisch nicht unterscheidbar.

Die Gesamtheit der Isotopenkonfigurationen für ein Element ergibt sich deshalb aus der Anzahl der Möglichkeiten, aus n_E verschiedenen Isotopen e Isotope mit Wiederholung und ohne Beachtung der Reihenfolge auszuwählen [155]:

$$C_e^{(n_E)} = \binom{n_E + e - 1}{e} = \frac{(n_E + e - 1)!}{e!(n_E - 1)!} \quad (3.13)$$

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Isotopenkonfiguration $E_1E_2E_3\dots E_{n_E}$ berechnet sich aus dem Produkt der Wahrscheinlichkeiten für das e_i -te Auftreten des Isotops $(P_{E_i})^{e_i}$ multipliziert mit der Anzahl der Permutationen der betreffenden Isotopenkonfiguration.

$$P(E) = \frac{e!}{\prod_{i=1}^{n_E} e_i!} * \prod_{k=1}^{n_E} P_{E_k}^{e_k} = e! * \prod_{i=1}^{n_E} \frac{P_{E_i}^{e_i}}{e_i!} \quad (3.14)$$

Für eine aus mehreren Elementen bestehende chemische Verbindung können die unabhängigen Wahrscheinlichkeiten der elementaren Isotopenkonfigurationen miteinander multipliziert werden und man erhält für die Auftrittswahrscheinlichkeit einer Isotopenkonfiguration in einer chemischen Verbindung den Ausdruck [156].

$$P(F) = \prod_{\substack{E=Z \\ E=A \\ e=a}}^{E=Z} \left\{ e! * \prod_{i=1}^{n_E} \frac{P_{E_i}^{e_i}}{e_i!} \right\} \quad (3.15)$$

3.2.2. Berechnungsmethoden

Es gibt verschiedene Methoden, das theoretische Isotopenmuster einer vorgegebenen EK zu berechnen, deren Unterschiede im rechnerischen Aufwand und in der Genauigkeit der Ergebnisse liegen.

3.2.2.1. Polynominal-Methode

Mit der Polynominal-Methode können alle möglichen Isotopenkonfigurationen einer EK und deren Auftrittswahrscheinlichkeiten bestimmt werden. In Abbildung 3.5 ist die Vorgehensweise zur Erzeugung der Isotopenkonfigurationen schematisch dargestellt.

Beginnend mit dem ersten Element einer EK, in Abbildung 3.5 wurde Kohlenstoff gewählt, werden neue Isotopenkonfigurationen gebildet, indem zur vorherigen Kombination jeweils eines der möglichen Isotope des Elementes hinzugefügt wird.

Die Masse einer neu gebildeten Kombination wird durch Addition der Masse des hinzugefügten Isotops zur Masse der vorherigen Konfiguration bestimmt, die Auftretswahrscheinlichkeiten werden in gleicher Weise miteinander multipliziert. Diese Expansion wird mit den gebildeten Konfigurationen des vorhergehenden Schrittes solange wiederholt, bis die notwendige Anzahl des betrachteten Elementes erreicht wird. Nach jedem Expansionsschritt werden Kombinationen mit der gleichen Isotopenkonfiguration, die Permutationen, zusammengefasst und gezählt. Mit den erhaltenen Konfigurationen des ersten Elementes wird durch Hinzufügen der Isotope des nächsten Elementes in gleicher Weise fortgefahren.

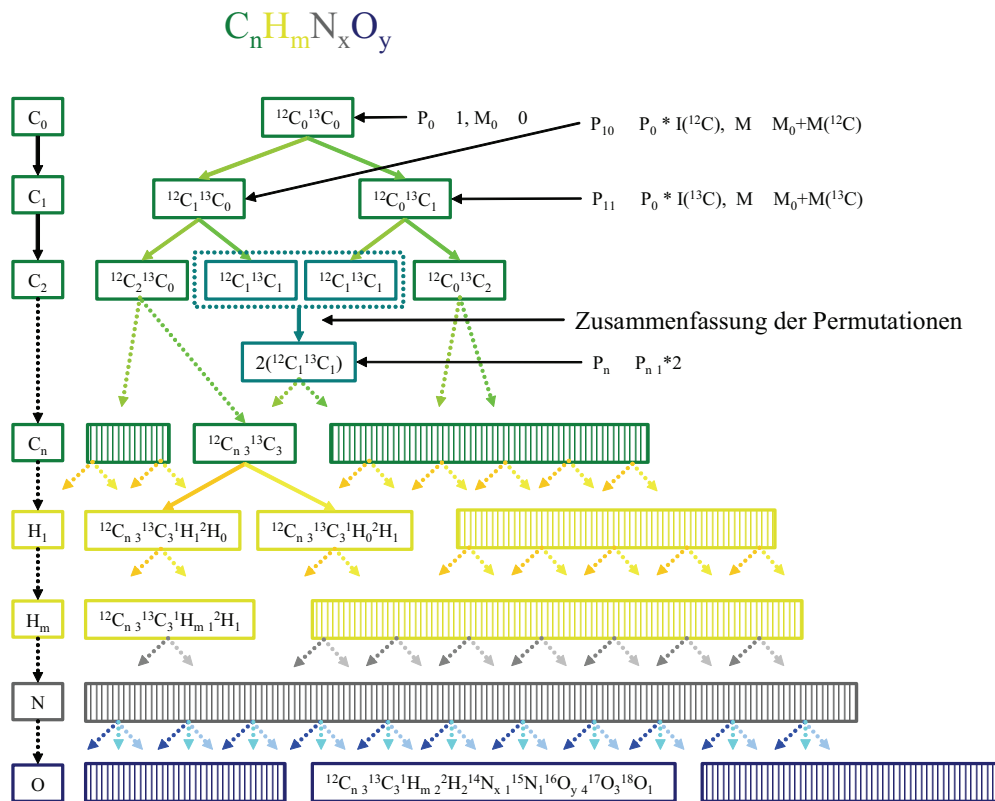


Abbildung 3.5: Algorithmus zur Bestimmung der Isotopenkonfigurationen einer EK

Diese Vorgehensweise entspricht mathematisch der Auflösung des Polynoms:

$$\left(P_{A_1} A_1 + P_{A_2} A_2 + P_{A_3} A_3 + \dots \right)^a * \left(P_{B_1} B_1 + P_{B_2} B_2 + P_{B_3} B_3 + \dots \right)^b \dots \quad (3.16)$$

Jeder resultierende Term entspricht der Auftrittswahrscheinlichkeit einer Isotopenkonfiguration. Deshalb wurde für diese Methode in der Fachliteratur der Begriff polynomiale Methode geprägt [157].

Ohne die Zusammenfassung der Permutationen einer Konfiguration nach jedem Expansionsschritt generiert der Algorithmus alle Kombinationen unter Beachtung der Reihenfolge, d.h. alle möglichen Variationen. Für eine Verbindung mit der Summenformel $C_{153}H_{224}N_{42}O_{50}S_1$ (Glucagon) ergeben sich $(2^{153} \cdot 2^{224} \cdot 2^{42} \cdot 3^{50} \cdot 4^1) = 3,9 \cdot 10^{150}$ verschiedene Variationen. Nach Gleichung (3.13) ist die Zahl der Isotopenkonfiguration dieser EK mit $7,903 \cdot 10^9$ zwar deutlich geringer, aber es ist leicht einzusehen, dass der exponentielle Anstieg der Zahl der Isotopenkonfigurationen mit steigender Anzahl polyisotopischer Elemente die praktische Anwendung des Algorithmusses in dieser Form auf niedermolekulare Verbindungen beschränkt.

Zur Steigerung der Effektivität schlug J. Yergey [158] vor, nach jedem Expansionsschritt die Konfigurationen mit einer unter einem definierten Grenzwert liegenden Intensität zu streichen („*Pruning*“) und damit ihre Anzahl zu reduzieren. Dies ist sinnvoll, da durch den beschriebenen Algorithmus jede mögliche Isotopenkonfiguration gebildet wird, von denen aber viele nur sehr kleine relative Intensitäten aufweisen und deshalb nur wenig zum resultierenden Muster beitragen. Betrachtet man die sechs Isotopenkonfigurationen von Kohlenmonoxid $^{12}C^{16}O$, $^{12}C^{17}O$, $^{12}C^{18}O$, $^{13}C^{16}O$, $^{13}C^{17}O$ und $^{13}C^{18}O$ dann haben alle Konfigurationen mit den schweren Sauerstoffisotopen ^{17}O und ^{18}O aufgrund des geringen Vorkommens dieser Isotope sehr geringe Intensitäten und es verbleiben nur zwei signifikante Konfigurationen, die das Isotopenmuster dieser Verbindung bestimmen (vgl. Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Isotopenkonfigurationen von Kohlenmonoxid (CO). Die beiden signifikanten Konfigurationen sind hervorgehoben.

Konfiguration	Exakte Masse [Da]	relative Auftrittswahrscheinlichkeit P
$^{12}C^{16}O$	27.994915	0.9866264
$^{12}C^{17}O$	28.999133	0.0003956
$^{12}C^{18}O$	29.999160	0.0019780
$^{13}C^{16}O$	28.998270	0.0109736
$^{13}C^{17}O$	30.002488	0.0000044
$^{13}C^{18}O$	31.002515	0.0000220

Um zu berücksichtigen, dass sich die absoluten Intensitäten der Konfigurationen nach jedem Expansionsschritt verringern, weil sich ihre Anzahl nach jedem Schritt mindestens verdoppelt¹⁹ und ihre Summe laut Definition eins ist, ist es notwendig, die absolute Intensitätsschwelle nach jedem Expansionsschritt neu festzulegen. Durch Verwendung einer relativen, auf die maximale absolute Intensität einer Iteration bezogenen, Intensitätsschwelle kann die mit diesem Verfahren verbundene Verzerrung des Spektrums begrenzt werden [159].

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion des Rechenaufwandes besteht in der Begrenzung der Anzahl der Konfigurationen, indem überzählige Konfigurationen nach jedem Expansionsschritt gestrichen werden [160]. Allein stehend ist diese Methode allerdings nur bei kleinen Molekülen anwendbar, denn mit steigender Masse verbreitern und verschieben sich Isotopenmuster derart, dass die Gefahr besteht, durch diese Vorgehensweise signifikante Teile des Isotopenmusters abzuschneiden [158]. M. W. Senko verwendet in seinem Programm „IsoPro“ eine Kombination aus beiden Verfahren, bei der er sowohl eine relative Intensitätsschwelle festlegt als auch die Anzahl der Konfigurationen begrenzt wird [161]. Für den Fall, dass die Anzahl der Konfigurationen den Maximalwert nach einem Iterationsschritt überschreitet, wird die Intensitätsschwelle schrittweise inkrementiert. Durch eine erhöhte Intensitätsschwelle können weitere Isotopenkonfigurationen ausgeschlossen werden. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass wie bei Yergey nur Isotopenkonfigurationen vernachlässigt werden, die von relativ geringer Signifikanz sind und zusätzlich der Rechenaufwand (Zeit und Speicher) begrenzt wird, weil nur eine definierte maximale Anzahl an Konfigurationen pro Iteration berechnet und weiterverarbeitet wird und die Zahl der Iterationen durch die Anzahl der Elemente bestimmt wird.

Eine letzte Variante zur Reduktion der Isotopenkonfigurationen sei an dieser Stelle noch genannt. Sie beruht auf der Festlegung eines Massenfensters, also einer Minimal- und Maximalmasse, in dem die Isotopenkonfigurationen liegen dürfen. Konfigurationen, die leichter oder schwerer sind, werden nach jeder Iteration ausgeschlossen. Durch die Auswahl eines geeigneten Massefensters kann die Verbreiterung und Verschiebung der Isotopenmuster mit steigender isotopischer Komplexität berücksichtigt werden. Allerdings ist die Bestimmung eines geeigneten Massenbereichs bei isotopisch komplexen Verbindungen schwierig und wieder mit

¹⁹ Bei monoisotopischen Elementen bleibt die Anzahl der Kombinationen (Konfigurationen) konstant.

der Gefahr verbunden, signifikante Konfigurationen außerhalb des festgelegten Fensters zu ausschließen und das resultierende Muster stark zu verzerrern [162].

Abgesehen von den durch das so genannte „*Pruning*“ ausgeschlossenen Konfigurationen, erzeugt der beschriebene Algorithmus eine vollständige Liste aller möglichen Isotopenkonfigurationen mit infiniten Auflösung, inklusive deren Intensitäten und deren Massen. Viele dieser Konfigurationen unterscheiden sich in ihrer Masse nur geringfügig und werden deshalb in einem realen Massenspektrometer mit begrenzter Auflösung nicht getrennt dargestellt. So beträgt der Massenunterschied zweier isobarer ($M+2$) Konfigurationen einer bromhaltigen Kohlenstoffverbindung $R^{12}C_2^{81}Br$ und $R^{13}C_2^{79}Br$ nur 0,008757 Da und ist somit nur in ultrahochauflösenden Massenspektrometern darstellbar. Für eine realistische Simulation muss deshalb die auflösungsabhängige Überlagerung isobarer Isotopenpeaks im Massenspektrometer berücksichtigt werden.

Dazu wird das Isotopenmuster als eine Summe von Impulsfunktionen δ mit der Höhe P_i und der Position m_i der bestimmten Isotopenkonfigurationen i aufgefasst.

$$IP(m) = \sum_i P_i \delta(m - m_i) = P_1 \delta(m - m_1) + P_2 \delta(m - m_2) + \dots \quad (3.17)$$

Dieses Strichspektrum beschreibt die spektrale Darstellung des Isotopenmusters in einem Massenspektrum mit unendlicher Auflösung. Jeder Summand des Musters wird mit einer dem Instrument entsprechenden Hüll- oder „*Peak Shape*“-Funktion überlagert. Die für ein Ion bestimmten Massenwerte sind, unabhängig vom eingesetzten Analysatortyp, bei einer ausreichenden Anzahl an Messwerten (Ionen) um den realen Wert normal verteilt angeordnet. Aus diesem Grund bietet sich als „*Peak Shape*“-Funktion die Gaußfunktion mit einem globalen Maximum von Eins an [163, 164].

$$PS(m) = \exp\left(-\frac{m^2}{\sigma^2}\right) \quad (3.18)$$

Mathematisch entspricht die Überlagerung der Isotopenpeaks mit der Hüllfunktion einer Faltung beider Funktionen, die definiert ist als:

$$f(t) * g(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau) g(t - \tau) d\tau \quad (3.19)$$

Die Ausblendeigenschaft der Impulsfunktion vereinfacht das Integral nach Einsetzen von Gleichung (3.17) und (3.18) zu einer Summe von Hüllfunktionen mit den Maxima P_i an den Positionen m_i :

$$I_p(m) = PS(m) * IP(m) = \sum_i PS(m - m_i) P_i = P_1 \exp\left(-\frac{(m - m_1)^2}{\sigma^2}\right) + P_2 \exp\left(-\frac{(m - m_2)^2}{\sigma^2}\right) + \dots \quad (3.20)$$

Der Parameter σ bestimmt die Breite der Gaußverteilung und muss entsprechend der instrumentellen Auflösung ($R_{FWHM} = m/\Delta m_{50\%}$) bestimmt werden. Nach dem Peakbreiten-Kriterium ist die Auflösung durch die Peakbreite $\Delta m_{50\%}$ bei halber Peakhöhe definiert. Durch Einsetzen der Funktionswerte ($\Delta m_{50\%}/2$, $1/2$) in (3.18) erhält man für σ in Abhängigkeit von der instrumentellen Auflösung R_{FWHM} und der Masse m die Gleichung:

$$\sigma = \frac{m}{R_{FWHM}} (-4 \ln 0.5)^{-0.5} \quad (3.21)$$

Diskretisierung

Für die computergestützte Berechnung des Isotopenmusters ist es erforderlich, den relevanten Massenbereich auf eine endliche Anzahl von Datenpunkten j abzubilden. Dazu wird die Anzahl der Punkte festgelegt, mit der ein Peak im Massenbereich $\Delta m_{50\%}$, also der Spitze eines Peaks (vgl. Abbildung 3.1), diskretisiert werden soll. Für eine akkurate Abbildung des gesamten Peaks sind im Allgemeinen 20 Punkte ausreichend und damit genügen ca. $w = 10$ Datenpunkte für den Bereich des Peaks um $\pm \Delta m_{50\%}/2$ [163]. Der für die Berechnung relevante Massenbereich eines Musters wird durch die leichteste (m_{\min}) und die schwerste (m_{\max}) Isotopenkonfiguration bestimmt. Die Anzahl der Datenpunkte NP berechnet sich dann zu $NP = (\text{int})((m_{\max} - m_{\min})/(\Delta m_{50\%} * w))$, und die lineare Abbildung der Datenpunkte j auf den Massenbereich erfolgt nach der Gleichung:

$$m(j) = m_{\min} + j(m_{\max} - m_{\min}) / (NP - 1) \quad (3.22)$$

Die Berechnung der Hüllkurve einer Isotopenkonfiguration kann auf einen kleinen Bereich um ihr globales Maximum (m_i) beschränkt werden. Im Intervall von $\pm 10\sigma$ um die Masse m_i fällt die Gaußfunktion auf den $\exp(-100) = 3.72 \cdot 10^{-44}$ -ten Teil der maximalen Peakintensität P_i und wird damit vernachlässigbar klein [165].

Der berechnete Intensitätsverlauf ($j, I(j)$) einer einzelnen Isotopenkonfiguration wird anschließend zum resultierenden Muster addiert. Dieser Vorgang wird sukzessive für alle Isotopenkonfigurationen wiederholt. Das resultierende Muster ergibt sich aus der additiven Überlagerung der separaten Intensitätsverläufe der Isotopenkonfigurationen.

Die Bestimmung der resultierenden Peaks ($m_i, I(m_i)$) aus den berechneten Datenpunkten („Peak Picking“) wird in Kapitel 3.3.4 beschrieben.

3.2.2.2. Fourier-Transformationsbasierte Methode

Wie in Kapitel 3.2.2.1 gezeigt wurde, führt die kombinatorische Explosion der Anzahl der Isotopenkonfigurationen mit zunehmender isotopischer Komplexität und steigender Masse einer Verbindung zwangsläufig zu langen Berechnungszeiten bei großen Biopolymeren wie DNS oder Proteinen. Die beschriebenen Optimierungsstrategien sind in der Lage, die Berechnungszeiten der Polynominal-Methode zu reduzieren, führen aber mit steigender Masse zunehmend zu einer Verzerrung des berechneten Musters und stellen einen Kompromiss zwischen benötigter Genauigkeit und geringer Berechnungszeit dar.

Eine effektivere Methode zur Berechnung der Isotopenmuster komplexer Makromoleküle wurde von Rockwood *et al.* vorgestellt [166-168].

Die Expansion des Polynoms aus Gleichung (3.16) wird bei dieser Methode in eine Faltung elementarer Isotopenmuster überführt.

Die Isotopenverteilung eines Elementes kann als eine Summe von Impulsfunktionen mit der Isotopenmasse m_{E_i} und der Höhe P_{E_i} aufgefasst werden, äquivalent zur Darstellung des resultierenden Musters einer Verbindung aus Gleichung (3.17).

$$F_E(m) = \sum_{i=1}^{n_E} P_{E_i} \delta(m - m_{E_i}) \quad (3.23)$$

Durch inverse Fourier-Transformation in den Bildbereich μ erhält man eine äquivalente Darstellung von Gleichung (3.23):

$$IFT[F_E(m)] = f_E(\mu) = \sum_{i=1}^{n_E} P_{E_i} \exp(m_{E_i} i 2\pi \mu) \quad (3.24)$$

die das Isotopenmuster eines Atoms des Elementes E als eine Summe harmonischer Funktionen, deren Frequenz durch die Massen m_{E_i} der Isotope des Elementes E bestimmt werden, beschreibt. Für beliebig viele Atome des Elementes E erhält man im Massenbereich das resultierende Muster durch e-malige Faltung des elementaren Musters mit sich selbst, was der Expansion des Polynoms aus Gleichung (3.16) entspricht. Nach dem Faltungstheorem entspricht eine n-fache Faltung im Originalbereich einer n-fachen Multiplikation der Fourier-Transformierten Funktion mit sich selbst im Bildbereich [155].

$$f_{E_e}(\mu) = [f_E(\mu)]^e \quad (3.25)$$

In der Polarform lässt sich die Potenz einer komplexen Zahl in einem Schritt berechnen, wodurch die sukzessive Expandierung des Polynoms vermieden werden kann. Das resultierende Isotopenmuster eines Elementes mit beliebiger Anzahl kann so in einem Rechenschritt bestimmt werden. Die notwendigen Additionen werden mit komplexen Zahlen in der kartesischen Form durchgeführt.

Das Muster einer chemischen Verbindung verschiedener Elemente kann in der gleichen Weise durch Faltung der elementaren Muster bzw. durch Multiplikation der elementaren Muster im Bildbereich bestimmt werden.

$$f(\mu) = \prod_{\substack{E=Z \\ e=z \\ E=A \\ e=a}}^{E=Z} [f_E(\mu)]^e \quad (3.26)$$

Auch in diesem Fall muss das resultierende Muster mit einer „Peak Shape“-Funktion gefaltet werden, um den Einfluss der instrumentellen Auflösung auf das Isotopenmuster zu berücksichtigen,

$$ps(\mu) = IFT[PS(m)] \quad (3.27)$$

was an dieser Stelle im Bildbereich durch Multiplikation mit der invers Fourier-Transformierten der gewählten Hüllfunktion erfolgt. Die inverse Fourier-Transformation der Gaußfunktion ergibt wieder eine Gaußfunktion²⁰.

$$ps(\mu_j) = \exp\left[-\frac{\mu_j^2 w^2}{N^2}\right] \quad (3.28)$$

N repräsentiert die Anzahl der Datenpunkte, die Variable μ_j berechnet sich aus dem Datenpunkt j ($0 \leq j < N$) zu $\mu_j = j - N/2$. Der Parameter w bestimmt die Breite der Gaußfunktion im Bildbereich und wird entsprechend der auflösungsabhängigen Peakbreite in der Massendomäne zu $w = \sigma * \pi$ bestimmt.²¹

Das resultierende Isotopenmuster erhält man im Anschluss durch Fourier-Transformation des Produktes aus „Peak Shape“-Funktion und Isotopenmuster.

$$F(m) = FT[ps(\mu)f(\mu)] \quad (3.29)$$

Um die zur Erfüllung des Nyquist Kriteriums benötigte Anzahl der Abtastpunkte und damit den Speicherbedarf zu reduzieren, ist es notwendig, die Isotopendistribution im Bildbereich um den Nullpunkt zu verschieben. Dies entspricht im Massenbereich der Subtraktion (Verschiebung des Musters) einer Masse m_0 , welche z.B. die chemische Masse der Verbindung sein kann, und entspricht im Bildbereich einer Division (Überlagerung) aller harmonischen Anteile durch die der Masse m_0 entsprechenden harmonischen Funktion $\exp(-m_0 i 2 \pi \mu)$ und führt somit zu einer proportionalen Verringerung der Frequenzen aller oszillierenden Anteile des Isotopenmusters.

$$F(m - m_0) = FT[ps(\mu)f(\mu)\exp(-m_0 i 2 \pi \mu)] \quad (3.30)$$

²⁰ Der konstante Proportionalitätsfaktor wurde weggelassen.

²¹ Zur Bestimmung von σ siehe Gleichung (3.21).

Für die Diskretisierung gilt unter Berücksichtigung der Überlagerung mit einer „Peak Shape“-Funktion das Gleiche wie das in Abschnitt 3.2.2.1 Gesagte. Die Anzahl der benötigten Datenpunkte ergibt sich wiederum aus der gewünschten Auflösung, der Hüllfunktion, dem Massenbereich und der Anzahl der Punkte w , mit der der Peak diskretisiert werden soll.

Eine maximale Abschätzung des Massenbereichs kann durch Berechnung der leichtesten, monoisotopischen und der schwersten Isotopenkonfiguration der Verbindung erfolgen. Dieser Bereich ist für praktische Anwendungen allerdings immer zu groß. Für die EK C_{100} würde auf diese Weise ein Bereich von 1200 Da ($^{12}C_{100}$) bis 1300,35 Da ($^{13}C_{100}$), also etwa 100 Da, bestimmt werden. Da der dynamische Bereich bei der Intensitätsmessung realer Massenspektrometer begrenzt ist, könnte man selbst für ein intensives Isotopenmuster dieser EK nur vier oder fünf Isotopenpeaks beobachten. Für die Berechnung würde also ein Massenbereich von 10 Da ausreichen. Bei dieser Methode steigt der Rechenaufwand mit der Anzahl der zu berechnenden Datenpunkte und diese hängt wiederum direkt vom simulierten Massenbereich ab. Darum ist eine Reduzierung des zu berücksichtigenden Massenbereiches im Hinblick auf eine effiziente Berechnung angebracht. Eine Möglichkeit wurde von Rockwood *et al.* vorgestellt, bei der für jedes Element eine Standardabweichung der Isotopenmassen von der chemischen Masse berechnet wird und die Standardabweichung mit den Auftretswahrscheinlichkeiten der Isotope gewichtet wird [169].

$$\sigma_j = \sqrt{\sum_k I_{jk} \left(m_{jk} - \sum_h I_{jh} m_{jh} \right)^2} \quad (3.31)$$

Die innere Summe repräsentiert die chemische Masse des Elementes j und die äußere Summe das Quadrat der Standardabweichung. Für das Element Kohlenstoff wird auf diese Weise eine Standardabweichung von 0.105 Da bestimmt. Die Standardabweichung einer Verbindung mehrerer Elemente j mit der Anzahl n_j resultiert aus der quadratischen Summe der elementaren Standardabweichungen, die mit der Anzahl n_j des Elementes j multipliziert werden.

$$\sigma = \sqrt{\sum_j n_j \sigma_j^2} \quad (3.32)$$

Je größer die Anzahl eines Elementes wird oder je größer die elementare Standardabweichung ist, desto breiter wird das experimentell bestimmbare Isotopenmuster und desto größer wird σ bestimmt. Die Standardabweichung liefert somit einen analytischen Ausdruck für die erwartete Breite des zu simulierenden Isotopenmusters und damit für den zu berücksichtigenden Massenbereich M_R . Dieser kann durch folgende Gleichung abgeschätzt werden:

$$M_R = k\sqrt{1 + \sigma^2} \quad (3.33)$$

Der Parameter k und die Addition von 1 zum Quadrat der Standardabweichung dienen dazu, auch für relativ kleine Moleküle einen ausreichenden Massenbereich zu bestimmen. Für den Parameter k wird ein Wert 10 angegeben, bei dem sichergestellt ist, dass der Massenbereich in keinem Fall zu klein bestimmt wird. Für die EK C_{100} wird auf diese Weise ein Massenbereich M_r von 14,5 Da bestimmt, welcher in jedem Fall groß genug ist, um alle experimentell relevanten Isotopenpeaks dieser EK zu beinhalten. Die untere Grenze des Massenbereiches wird durch die monoisotopische Masse festgelegt. Somit müsste die Berechnung des Musters von C_{100} in einem Bereich von 1200-1215 Da erfolgen.

Nach Bestimmung des erforderlichen Massenbereiches wird die Anzahl der Datenpunkte N über die gewünschte Auflösung (Δm) und die Anzahl der Punkte w , mit der der Bereich Δm diskretisiert werden soll, berechnet. Dabei ist zu beachten, dass die erforderliche Fourier-Transformation der Datenpunkte durch den FFT-Algorithmus besonders effizient berechnet werden kann, wofür die Anzahl der Datenpunkte eine Potenz von Zwei sein muss [97, 170]. Dies bedingt eine Erhöhung der Anzahl der Datenpunkte auf die nächstliegende Potenz von Zwei und eine Korrektur der oberen Grenze des Massenbereiches, damit die Anzahl der Datenpunkte pro Da bzw. die Dichte der Datenpunkte konstant bleibt. Der Abstand zwischen zwei Datenpunkten bzw. das Diskretisierungsintervall Δ ergibt sich aus dem Kehrwert der Dichte der Datenpunkte. Die Diskretisierung im Bildbereich erfolgt nach (3.34) [170]:

$$\mu_j = \frac{j - N/2}{N\Delta}, \quad j = 0, \dots, N-1 \quad (3.34)$$

Die Masse m , die den diskreten Wertebereich von M_{\min} bis $M_{\min} + (N-1) \cdot \Delta$ durchläuft, wird im Bildbereich μ auf den Bereich $-1/(2\Delta)$ bis $1/(2\Delta)$ abgebildet. Der Datenpunkt $j = N/2$ im Bildbereich ($\mu = 0$) entspricht im Originalbereich der Masse m_0 aus Gleichung (3.30). Aus den berechneten Datenpunkten kann die originale Massenskalierung nach Fourier-Transformation der komplexen Datenpunkte durch Gleichung (3.35) wiederhergestellt werden.

$$m(j) = (j - N/2)\Delta + m_0 \quad (3.35)$$

Ablauf der Berechnung

Die Berechnung beginnt mit der Bildung der μ -Funktion des ersten Elementes nach Gleichung (3.24) und der Berechnung der komplexen Datenpunkte. Anschließend werden die Datenpunkte entsprechend der Anzahl des Elementes potenziert. Mit den weiteren Elementen wird in gleicher Weise Verfahren. Die komplexen Datenpunkte der Elemente werden darauf folgend entsprechend Gleichung (3.30) miteinander, sowie mit der invers Fourier-Transformierten der „Peak Shape“-Funktion und dem Filteranteil multipliziert. Das Ergebnis wird in die Massendomäne zurück transformiert und die ursprüngliche Massenskalierung der Datenpunkte durch Anwendung von Gleichung (3.35) wiederhergestellt. Die Bestimmung der Isotopenpeaks aus den berechneten Daten erfolgt äquivalent wie bei der Polynommethode und ist in Kapitel 3.3.4 erläutert.

Der Ablauf der Berechnung ist in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt.

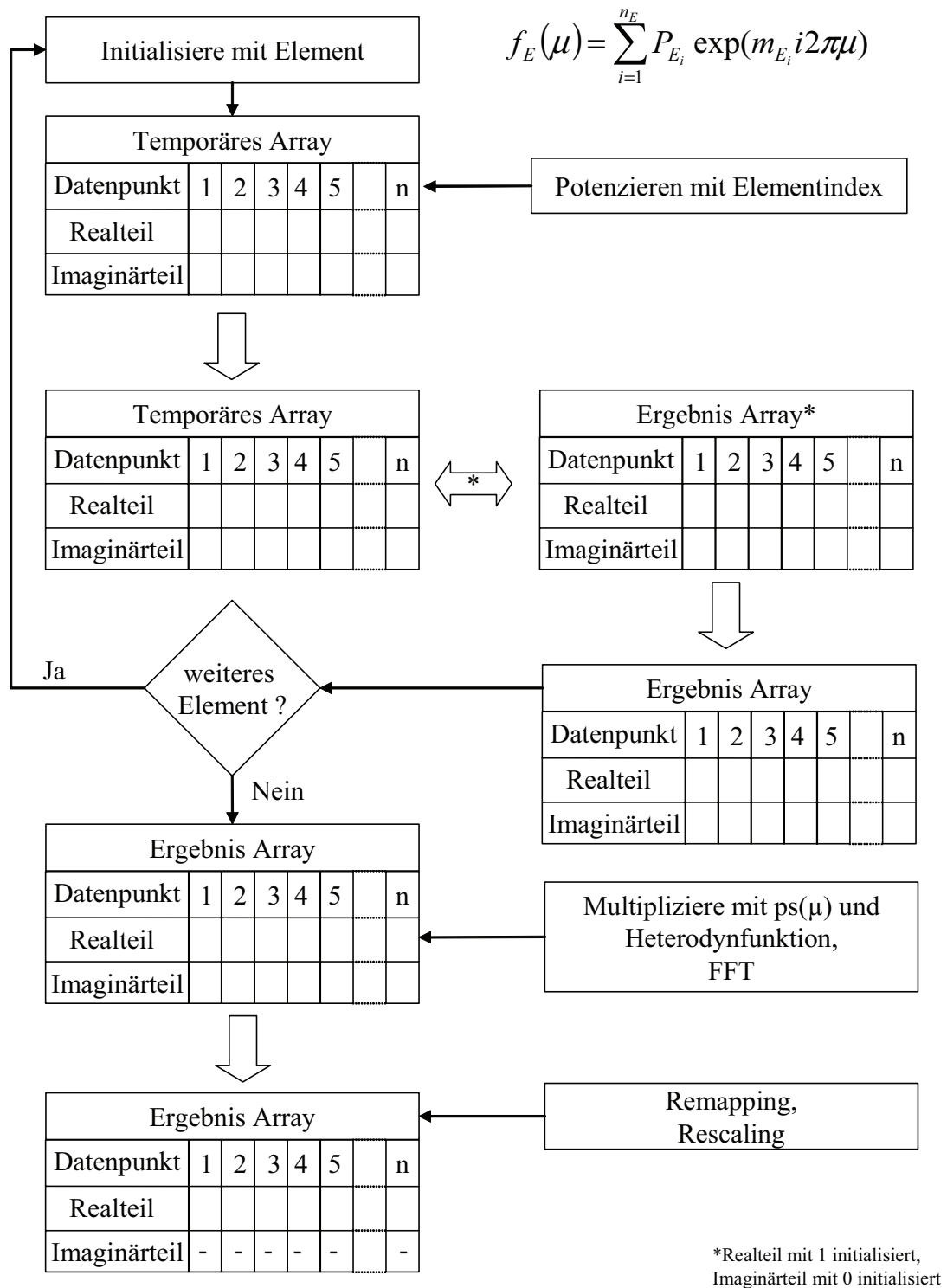


Abbildung 3.6: Ablaufplan der Berechnung des theoretischen Isotopenmusters einer beliebigen EK durch Faltung von elementaren Mustern durch Verwendung der Fourier-Transformation.

3.2.2.3. Berechnung durch diskrete Faltung

Eine besonders effiziente Berechnung des Isotopenmusters lässt sich durchführen, wenn man auf eine Auflösung der isotopischen Feinstruktur verzichtet und alle isobaren Anteile eines Musters zusammenfasst. Diese Vorgehensweise ist auf die im vorherigen Abschnitt 3.2.2.2 vorgestellte Methode übertragbar, wenn statt der exakten Isotopenmassen deren nominelle Massen eingesetzt werden [169]. Die Beschränkung auf nominelle Massen ermöglicht eine drastische Reduktion der Datenpunkte (genau einen Datenpunkt pro Da des Massenbereiches) und deshalb laufen alle Rechenoperationen (Multiplikationen und FFT) bedeutend schneller ab.

Die Zusammenfassung isobarer Isotopenkonfigurationen stellt eine Diskretisierung des Massenbereichs dar, denn die unendliche Anzahl möglicher Massenwerte in einem Massenbereich wird auf die endliche Anzahl ganzzahliger Massenwerte in diesem Bereich reduziert. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass sich das resultierende Isotopenmuster eines n-fach vorkommenden Elements E durch n-malige Faltung des elementaren Isotopenmusters bestimmen lässt und sich das Isotopenmuster einer Verbindung äquivalent dazu aus der Faltung der Isotopenmuster der enthaltenden Elemente ergibt. Die Diskretisierung des Massenbereiches ermöglicht es, die Faltung ohne vorherige Transformation mittels diskreter Faltung im Originalbereich durchzuführen [171]. Die Faltung zweier diskreter Funktionen ist definiert als:

$$H_p(k) = \sum_i G_p(i) F_p(k-i) \quad (3.36)$$

Es seien $G_p(i)$ und $F_p(j)$ ($j + i = k$) zwei Intensitätsvektoren der nominellen Isotopenmuster zweier Elementarkombinationen und $H_p(k)$ die aus der Faltung resultierende Intensitätsverteilung der Überlagerung beider Elementarkombinationen. Enthalten diese Elementarkombinationen nur ein Element, soll von elementaren Superatomen gesprochen werden, sind verschiedene Elemente enthalten, werden diese Elementarkombinationen als molekulare Superatome bezeichnet. Die Berechnung beginnt mit der n-fachen Faltung eines elementaren Intensitätsvektors mit sich selbst, also der Bildung eines elementaren Superatoms. Im Fall des Elementes Kohlenstoff enthält der elementare Vektor die zwei Intensitäten der Kohlenstoffisotope (0,98893, 0.01107). Die erste Faltung erfolgt mit dem Vektor

$F_p(1) = 1$. Die weiteren Faltungen erfolgen mit dem berechneten Vektor der vorherigen Faltung. Wenn die erforderliche Anzahl an Kohlenstoffatomen erreicht ist, wird mit dem nächsten Element in der gleichen Weise fortgefahren und durch Faltung des elementaren Superatoms mit dem Muster des neuen Elements ein molekulares Superatom bestimmt. Um das nominelle Muster von $C_{8004}H_{8010}$ zu berechnen, sind demzufolge $8004+8010 = 16014$ Faltungsoperationen durchzuführen.

Mit jeder Faltungsoperation vergrößert sich die Anzahl der Intensitäten, da sich die resultierende Anzahl k der diskreten Elemente einer Faltungsoperation aus der Summe der Elemente der Ausgangsfunktionen ergibt ($k = i + j$) und damit steigt der Rechen- und Speicheraufwand mit jedem hinzugefügten Atom. Yergey *et al.* zeigten, dass sich das Isotopenmuster mit zunehmender Anzahl eines Elementes verbreitert und einer Gaußverteilung immer ähnlicher wird [158]. Darum ist es möglich, den Vektor nach jedem Berechnungsschritt zu verkleinern, indem jeweils die ersten und die letzten Elemente²², deren Intensitäten kleiner als eine frei wählbare Intensitätsschwelle sind, gestrichen werden, ohne das Spektrum maßgeblich zu verzerren. Die absolute Intensitätsschwelle sollte dabei, wie in Abschnitt 3.2.2.1 erläutert wurde, relativ zur maximalen Intensität eines Vektors nach jeder Faltung neu bestimmt werden.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Anzahl der benötigten Faltungen deutlich zu reduzieren, indem das Muster jedes Elementes durch Faltung von binären, elementaren Superatomen berechnet wird und nicht durch schrittweise n -malige Faltung mit dem elementaren Grundmuster. Unter einem binären Superatom sind alle Muster eines Elementes zu verstehen, bei denen sich die Anzahl des Elementes auf eine Potenz von Zwei zurückführen lässt. Die Erzeugung der Intensitätsverteilungen der binären Superatome beginnt beim Index 1 (2^0) des betreffenden Elementes (z.B. C_1 , 2^0). Durch Faltung dieses Superatoms mit sich selbst erhält man das Muster des nächsten binären Superatoms (C_2 , 2^1). Dieses wird wiederum mit sich selbst gefaltet, so dass mit jedem Schritt die Anzahl der Atome verdoppelt wird. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis der Index der erzeugten Superatome den Index des zu berechnenden Elementes einer Verbindung überschreitet. Für das Beispiel C_{8004} müssen die Intensitätsverteilungen von 12 binären Superatomen gebildet werden: C_1 , C_2 , C_4 , C_8 , C_{16} , C_{32} , C_{64} , C_{128} , C_{256} , C_{512} ,

²² Hier sind Elemente des Arrays und nicht chemische Elemente gemeint.

C_{1024} , C_{2048} und C_{4096} , wofür 12 Faltungen erforderlich sind. Um zu bestimmen, welche dieser binären Superatome in dem zu berechnenden elementaren Superatom enthalten sind, wird der Index des Elementes in die binäre Darstellung überführt ($C_{8004} \rightarrow C_{1111101000100}$). Jede Eins entspricht einem binären Superatom der n-ten Potenz von Zwei mit n als binärer Stelle (vgl. Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Bestimmung der Zweierpotenzen einer binären Zahl

Bin. Stelle n	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Dez. Stellenwert 2^n	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Bsp. 8004	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0

Für die Berechnung des Intensitätsmusters von C_{8004} durch diskrete Faltung der enthaltenden binären Superatome C_4 , C_{64} , C_{256} , C_{512} , C_{1024} , C_{2048} und C_{4096} sind sechs Faltungen durchzuführen. Unter Berücksichtigung der 12 Faltungen, die zur Bildung der Superatome benötigt werden, ergibt sich eine Summe von 18 Faltungen und damit ein deutlich reduzierter Rechenaufwand im Vergleich zur schrittweisen Faltung, bei der 8004 Faltungen für die Berechnung des elementaren Superatoms des Elementes Kohlenstoff erforderlich sind [172].

Ein Algorithmus zur Berechnung der Isotopenmuster beliebiger Summenformeln sollte neben den Intensitäten zusätzlich auch akkurate Masseninformationen generieren [173]. Da sich die Berechnung des Musters auf einen Wert pro nomineller Masse beschränkt, ist ein direkter Vergleich mit den zuvor vorgestellten Methoden nur bedingt möglich, um die erzeugten Massenwerte zu validieren, da diese Methoden in Abhängigkeit von der gewählten Auflösung auch die isotopische Feinstruktur generieren.

Ein Kriterium, die Exaktheit der berechneten Massen zu bewerten, ist der Vergleich der chemischen Masse der Summenformel mit dem Summenprodukt der berechneten Masse-Intensitätspaare des Isotopenmusters. Je besser beide Massen übereinstimmen, desto exakter ist das berechnete Isotopenmuster. An dieser Stelle sei angemerkt, dass dies natürlich nur zutrifft, wenn auch die korrespondierenden Intensitäten exakt berechnet wurden, wovon bei der dargestellten Vorgehensweise ausgegangen wird.

Betrachtet man aus diesem Blickwinkel die resultierende Masse einer Überlagerung isobarer Isotopenpeaks als wahrscheinlichkeitsgewichtete Summe der Einzelmassen, äquivalent zur Berechnung der chemischen Masse einer Verbindung aus den Massen und Auftretswahrscheinlichkeiten der Isotope, kann man die resultierende Masse zweier überlagerter Isotopenpeaks wie in Abbildung 3.7 dargestellt berechnen [154].

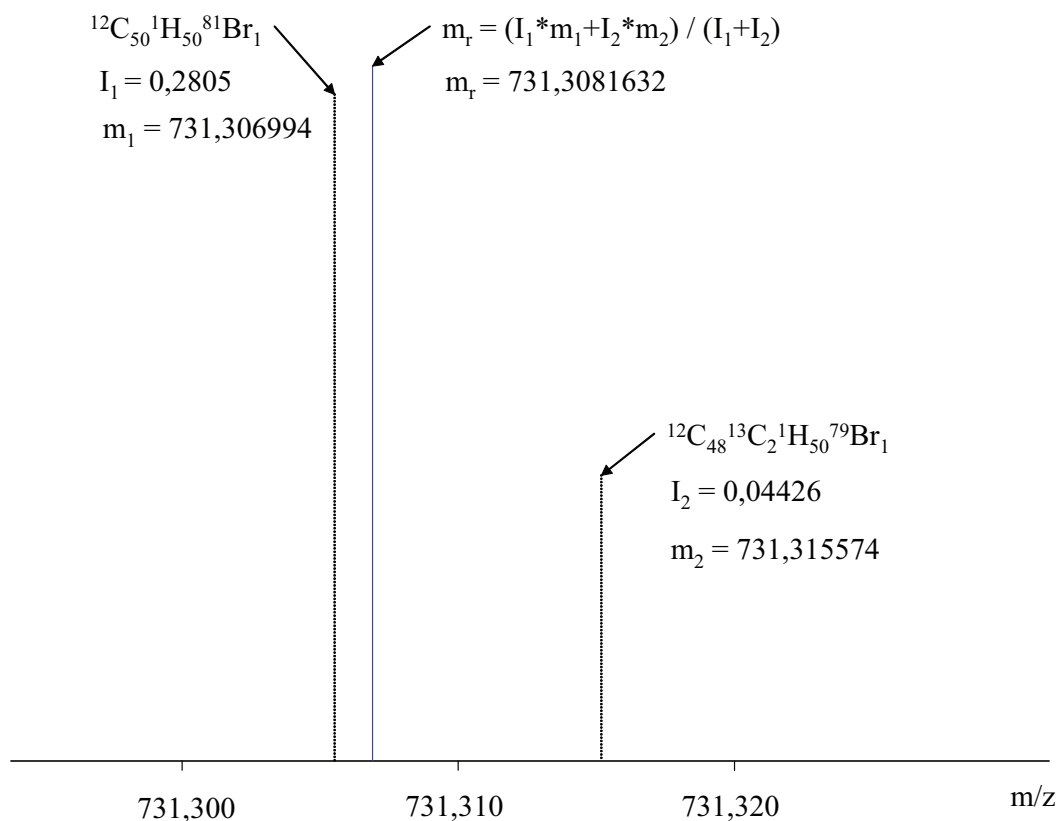


Abbildung 3.7: Berechnung der resultierenden Masse von zwei isobaren, überlagerter Isotopenkonfigurationen als wahrscheinlichkeitsgewichtete Summe der Einzelmassen

Überträgt man diesen Ansatz auf die Überlagerung (Faltung) beliebiger Isotopenmuster, erhält man für die resultierenden Massen eines Musters nach i Faltungen folgende Gleichung [174]:

$$H_m(k) = \frac{\sum_i [G_p(i) F_p(k-i) (G_m(i) + F_m(k-i))]}{\sum_i G_p(i) F_p(k-i)} \quad (3.37)$$

Damit kann in jedem Intervall von einem Da die wahrscheinlichkeitsgewichtete Masse der isobaren Isotopenkonfiguration, die dem oben genannten Kriterium einer akkuraten Generierung der chemische Masse für das gesamte Muster genügt, bestimmt werden.

3.2.3. Betrachtungen zur Genauigkeit der Intensitätsmessung im Massenspektrometer

Die Genauigkeit der Intensitätsbestimmung in Massenspektrometern hängt neben einer Reihe anderer Faktoren vor allem vom eingesetzten Analysatortyp ab. Die relative Standardabweichung bei der Bestimmung des Verhältnisses von Isotopenpeaks für Sektorfeld-MS, TOF-MS und Quadrupol-MS wird in der Literatur mit 1-6% angegeben [154, 175]. Ionenfallen, zu denen auch FTICR-MS zählen, unterliegen bei der Intensitätsmessung größeren Schwankungen, da sich Ionenpakete mit ähnlichen Massen und damit ähnlichen Zyklotronfrequenzen über Raumladungseffekte gegenseitig beeinflussen und durch Verlust der Kohärenz nach einer gewissen Zeit nicht mehr detektiert werden können [176]. Dies kann vor allem bei den hohen, für ultrahochauflösende FTICR-MS-Messungen benötigten Detektionszeiten zu einer deutlichen Verzerrung des experimentell bestimmten Isotopenmusters führen. Bresson *et al.* demonstrieren das Absinken der Intensitätskorrelation des Isotopenmusters von Rinder-Insulin von 99,6% nach einer Detektionszeit von 5 s auf 75% nach einer Detektionszeit von 40 s [177].

Ein weiterer Aspekt, der die Intensitätsverhältnisse eines Musters beeinflussen kann, ist die natürliche Variabilität der Isotopenzusammensetzung bestimmter Elemente in Substanzen, die biologischen Ursprungs sind [178]. Diese Variabilitäten sind, im Vergleich mit der instrumentellen Genauigkeit der Intensitätsbestimmung, relativ klein und beeinflussen das Isotopenmuster und damit die chemische Masse solcher Verbindungen erst in großen biologischen Molekülen wie Proteinen mit Massen von einigen 10 kDa, wobei in diesen Verbindungen vor allem die Variabilität von Kohlenstoff relevant ist [179, 180].

Tabelle 3.6: ^{13}C -Gehalt von Kohlenstoff in Abhängigkeit von seiner Herkunft [181]

Herkunft des Kohlenstoffs	% ^{13}C
atmosphärisches CO_2	1,106
C_3 -Pflanzen	1,080
C_4 -Pflanzen	1,095
fossile Stoffe	1,06 – 1,08

3.3. Methoden zur Reduktion der Lösungsmenge

In Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass die kombinatorische Anzahl der, einer Masse zugeordneten, EK mit steigender Masse und den zu berücksichtigenden Elementen exponentiell zunimmt. In diesem Abschnitt werden Methoden vorgestellt, mit denen die Menge gültiger EK reduziert werden kann.

3.3.1. Exakte Massenbestimmung

Die Zuordnung von Elementarkombinationen zu einer Masse ist aufgrund des exponentiellen Anstiegs ihrer Anzahl, mit steigender Masse und den im Molekül enthaltenden Elementen nur sinnvoll, wenn die Masse mit einer hohen Massengenauigkeit bestimmt wird und die Lösungsmenge stark eingeschränkt werden kann. Als exakt wird die Massenbestimmung bezeichnet, wenn ihr relativer Fehler kleiner als ± 5 ppm ist [182, 183].

Abbildung 3.8 zeigt die lineare Abhängigkeit der Anzahl der einer Masse zugeordneten Elementarzusammensetzungen von der absoluten Massengenauigkeit bei der Massenbestimmung anhand von drei Beispielen. Man erkennt eine deutliche Reduktion der Lösungsmenge mit zunehmender Massengenauigkeit. Jedoch kann in keinem der drei dargestellten Beispiele bei der höchsten absoluten Massengenauigkeit von $\pm 0,5 \text{ mDa}^{23}$ eine eindeutige Elementarkombination bestimmt werden.

²³ Relative Genauigkeiten: $\pm 2,7$ ppm bei 180 Da, $\pm 0,8$ ppm bei 608 Da und $\pm 0,4$ ppm bei 1347 Da.

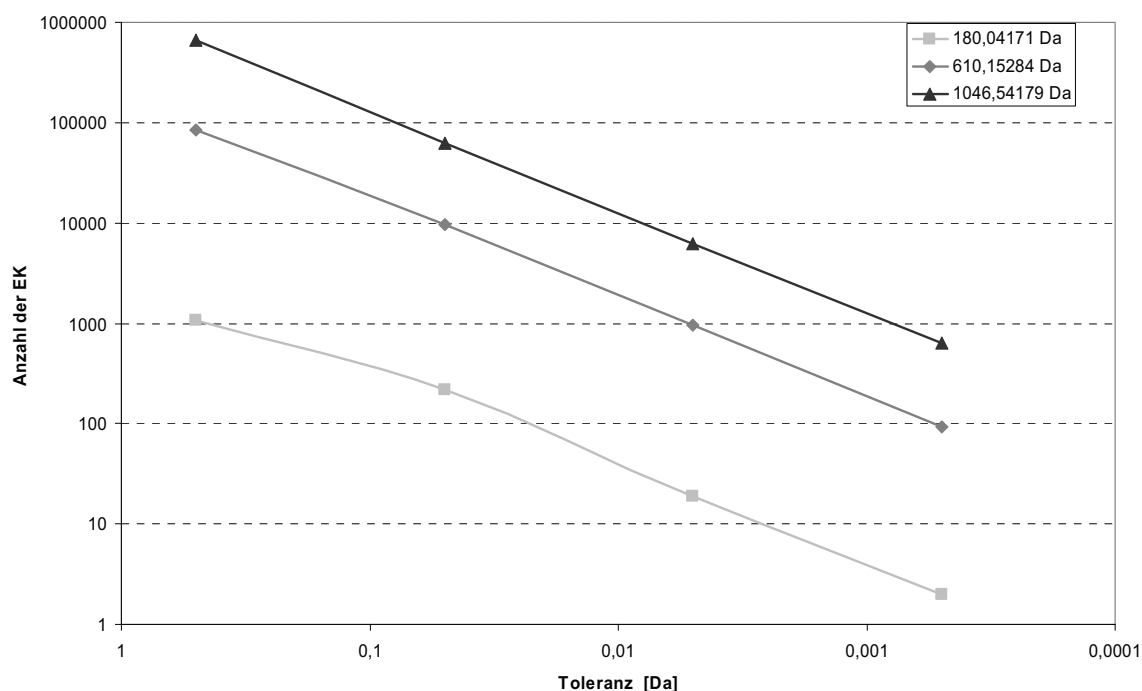


Abbildung 3.8: Anzahl der Elementarkombinationen aus den Elementen C, H, N, O und S für drei Ionen mit den Massen 180,04171 Da (Glukose, M⁺), 610,15284 Da (Rutin, M⁺) und 1046,54179 Da (Angiotensin II, M⁺) in Abhängigkeit von der Massengenauigkeit.

In der Praxis ist die exakte Massenbestimmung in einem Toleranzfenster von +/- 5 ppm zur eindeutigen Charakterisierung von unbekannten Verbindungen mit Massen von mehr als 150 Da, die aus den Elementen C, H, N, und O bestehen können, nicht ausreichend [184]. Hierbei ist zusätzlich zu beachten, dass viele Hersteller die Standardabweichung des Fehlers bei der Bestimmung der exakten Masse eines Massenspektrometers angeben, welche bei Einzelmessungen, deren Massengenauigkeit außerhalb dieser Abweichung liegen kann, nicht hinreichend groß genug ist, um „Ausreißern“ die korrekte EK zuzuordnen zu können [185, 186]. Liegen nur Einzelmessungen vor, müssen etwas größere Fehlerintervalle berücksichtigt werden. Um den Vorteil eines kleineren Fehlerintervalls nutzen zu können, muss eine Messung unter identischen Bedingungen wiederholt und die Mittelwerte der Massen zur Auswertung herangezogen werden, oder spezielle Kalibrierprozeduren angewandt werden, die ebenfalls mit wiederholten Messungen einhergehen können [186-188].

3.3.2. Ring-Doppelbindungsäquivalent - RDB-Filter

Jedes chemische Element besitzt eine definierte Anzahl an Valenzelektronen, die zur Ausbildung kovalenter Bindungen zu Verfügung stehen²⁴.

Zur Ausbildung einer einfachen Bindung zwischen zwei Atomen ist je ein Valenzelektron pro Atom erforderlich. Da immer zwei Valenzelektronen pro Bindung benötigt werden, ergibt sich die Anzahl der Bindungen k zwischen den Atomen einer Verbindung als die Hälfte der Summe der Valenzelektronen:

$$k = 0,5 * \sum_{i=1}^6 i * A_i \quad (3.38)$$

mit A_i als die Zahl i -wertiger Atome in der Verbindung.

Betrachtet man die Atome einer Verbindung als Knoten in einem Eulerschen Graphen, dann ergibt sich die Anzahl der Knoten p dieses Graphen als Summe der Atome:

$$p = \sum_{i=1}^6 A_i \quad (3.39)$$

Laut der Eulerschen Formel für einen Eulerschen Graphen resultiert die Zahl der Flächen F des Graphen aus der um eins erhöhten Differenz der Kanten und Knoten des Graphen:

$$F = k - p + 1 \quad (3.40)$$

Jede Doppelbindung und jeder Ring einer chemischen Struktur repräsentiert eine Fläche des Graphen. Dreifachbindungen werden in zwei parallele Doppelbindungen unterteilt und repräsentieren zwei Flächen. Die Anzahl der Flächen kann somit, übertragen auf chemische Verbindungen, als die Anzahl der Ringe und Doppelbindungen interpretiert werden.

Durch Einsetzen von (3.38) und (3.39) in (3.40) erhält man den Ausdruck für das Ring-Doppelbindungsäquivalent (RDB-Äquivalent) einer EK:

²⁴ Mehrzentrenbindungen finden in dieser Betrachtung keine Berücksichtigung.

$$RDB = -\frac{A_1}{2} + \frac{A_3}{2} + A_4 + \frac{3}{2}A_5 + 2A_6 + 1 \quad (3.41)$$

Je größer das RDB-Äquivalent einer EK ist, desto mehr Ringe und Doppelbindungen enthält die zugehörige chemische Struktur und desto ungesättigter ist das Molekül. Darum wird das Doppelbindungsäquivalent in der Literatur häufig auch als „*Degree of Unsaturation*“ (DU) bezeichnet.

Eine Verbindung mit einem RDB-Äquivalent von Null ist vollkommen gesättigt und kann keine Valenzelektronen mehr durch Aufspaltung von Ringen und Doppelbindungen freisetzen. Deshalb können einer solchen Verbindung keine weiteren einwertigen Atome hinzugefügt werden (H, Halogene). Bei einem Überschuss an einwertigen Atomen in einer EK wird das berechnete RDB-Äquivalent negativ. Wie in Abbildung 3.9 beispielhaft dargestellt ist, besitzen solche EK keine chemisch plausible strukturelle Repräsentation mehr und kommen deshalb als gültige EK einer chemischen Verbindung nicht in Frage. [189].

EK: C₂H₈ RDB: -1

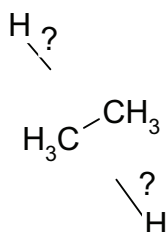


Abbildung 3.9: Beispiel für eine EK mit einem negativen RDB-Äquivalent für die keine sinnvolle strukturelle Repräsentation existieren kann.

Ist die Anzahl der Valenzelektronen ungerade, dann gibt es ein ungepaartes Bindungselektron in der neutralen Verbindung, das eine Radikalstelle darstellt. Im RDB-Äquivalent kommt dieses ungepaarte Elektron durch einen ungeradzahligem Wert des RDB-Äquivalents in der Form $X,5$ für ungeladene EK zum Ausdruck [28]. Berücksichtigt man das Fehlen bzw. den Überschuss eines Elektrons in positiv oder negativ geladenen Ionen, dann muss zum RDB-Äquivalent 0,5 subtrahiert oder addiert werden und die Verhältnisse kehren sich um. In den folgenden Ausführungen

wird die Ladung eines Ions bei der Berechnung des RDB-Äquivalents vernachlässigt und Gleichung (3.41) direkt angewendet.

Wenn bekannt ist, ob es sich bei einem experimentellen Ion um ein Radikalion handelt oder nicht, kann die Lösungsmenge ungefähr halbiert werden, denn es werden praktisch immer etwa gleich viele EK mit geradzahligen und ungeradzahligen RDB-Äquivalent erzeugt. Molekülonen, die durch ESI oder MALDI durch Anlagerung oder Verlust eines Protons entstehen, haben eine EK, für die nach Gleichung (3.41) ein ungeradzahliges RDB-Äquivalent berechnet wird. Molekülonen bei positiver EI entstehen durch Verlust eines Elektrons und ihre EK haben ein ganzzahliges RDB-Äquivalent.

3.3.3. Verhältnis von Kohlenstoff zu Heteroatomen

In der Praxis werden oft Verbindungen untersucht, die bestimmten Stoffklassen zugeordnet werden können (Alkane Alkene, Cycloalkane, Ketone, Aldehyde, Alkohole). In diesen Stoffklassen kann das Verhältnis bestimmter Elemente durch typische Vertreter dieser Klasse definiert werden. Bei gesättigten Kohlenwasserstoffen der Form $C_{n_C}H_{2 \cdot n_C + 2}$ (Alkane) kann zum Beispiel das notwendige Verhältnis von Kohlenstoff und Wasserstoff festgelegt werden. EKs, die diesem Verhältnis nicht entsprechen, können bei einer sicheren Zuordnung der untersuchten Verbindung in diese Stoffklasse vernachlässigt werden [148]. Oftmals kann auch die Zahl der Heteroatome n_{Het} im Verhältnis zu den enthaltenden Kohlenstoffatomen n_C in solchen Stoffklassen begrenzt werden.

$$v_{CHet} = \frac{n_C}{n_{Het}} \quad (3.42)$$

Organische Verbindungen, die aus den Elementen C, H, N und O bestehen, enthalten selten mehr Heteroatome (Sauerstoff- und Stickstoffatome) als Kohlenstoffatome und genügen einem $v_{CHetMin}$ von eins. Bei halogenierten Kohlenwasserstoffen wie zum Beispiel perfluorierten Verbindungen, bei denen diese Annahme aufgrund des hohen Fluor-Anteils nicht mehr zutrifft, muss das Verhältnis $v_{CHetMin}$ reduziert werden.

Im Gegensatz zum RDB-Filter, der nur ungültige EK ausschließt, beruht der Filtereffekt in diesem Fall auf zusätzlichen Annahmen über die untersuchte Verbindung. Deshalb muss beim Einsatz dieses Filters darauf geachtet werden, dass

durch diese Annahmen, sollten sie sich als falsch herausstellen, auch das korrekte Ergebnis ausgeschlossen wird [146].

3.3.4. Auswertung des spektralen Isotopenmusters - Isotopenmusteranalyse

In Kapitel 3.1.4 wurde auf die Korrelation zwischen dem Isotopenmuster und der EK einer Verbindung eingegangen. Die beschränkte Genauigkeit von Massenspektrometern bei der Intensitätsmessung erlaubt zwar keine eindeutige Zuordnung der EK zu einem Isotopenmuster im Massenspektrum, aber nichtsdestotrotz kann das experimentelle Isotopenmuster zur Validierung der einer exakten Masse zugeordneten EK verwendet werden.

Durch Auswertung der Intensitätsverhältnisse des monoisotopischen Peaks und charakteristischer Isotopenpeaks, meistens der (M+1) und der (M+2)-Peak eines Musters, kann der Anteil bestimmter Elemente abgeschätzt und damit die Lösungsmenge reduziert werden (vgl. Abschnitt 3.1.4). Als Elemente kommen dabei diejenigen in Frage, die aufgrund ihrer natürlichen Isotopenverteilung (Brom, Chlor, Schwefel (M+2) Peak) oder ihres großen Anteils in organischen Verbindungen (Kohlenstoff (M+1) Peak) signifikant zur Intensität des betrachteten Isotopenpeaks beitragen. Die Beschränkung des Anteils dieser Elemente reduziert die Anzahl der EK, allerdings ist die Anwendung auf Verbindungen beschränkt, bei denen die Voraussetzung zutrifft, dass ein Isotopenpeak durch das betrachtete Element verursacht wird und keine anderen Elemente mit signifikantem Muster oder hohem Anteil das Ergebnis verfälschen können [190-192].

Ein allgemeingültiger Ansatz zur Auswertung der Isotopenmuster-Informationen ist das „*Pattern Matching*“-Verfahren [22, 193, 194]. Dieses beruht prinzipiell darauf, die Peaks des theoretischen, simulierten Musters mit den Peaks des spektralen Musters im Hinblick auf ihre Intensitäten und exakten Massen zu vergleichen und die Übereinstimmung zu bewerten. Bei einer unzureichenden Übereinstimmung der Muster kann die EK als Lösung ausgeschlossen werden, vgl. Abbildung 3.10.

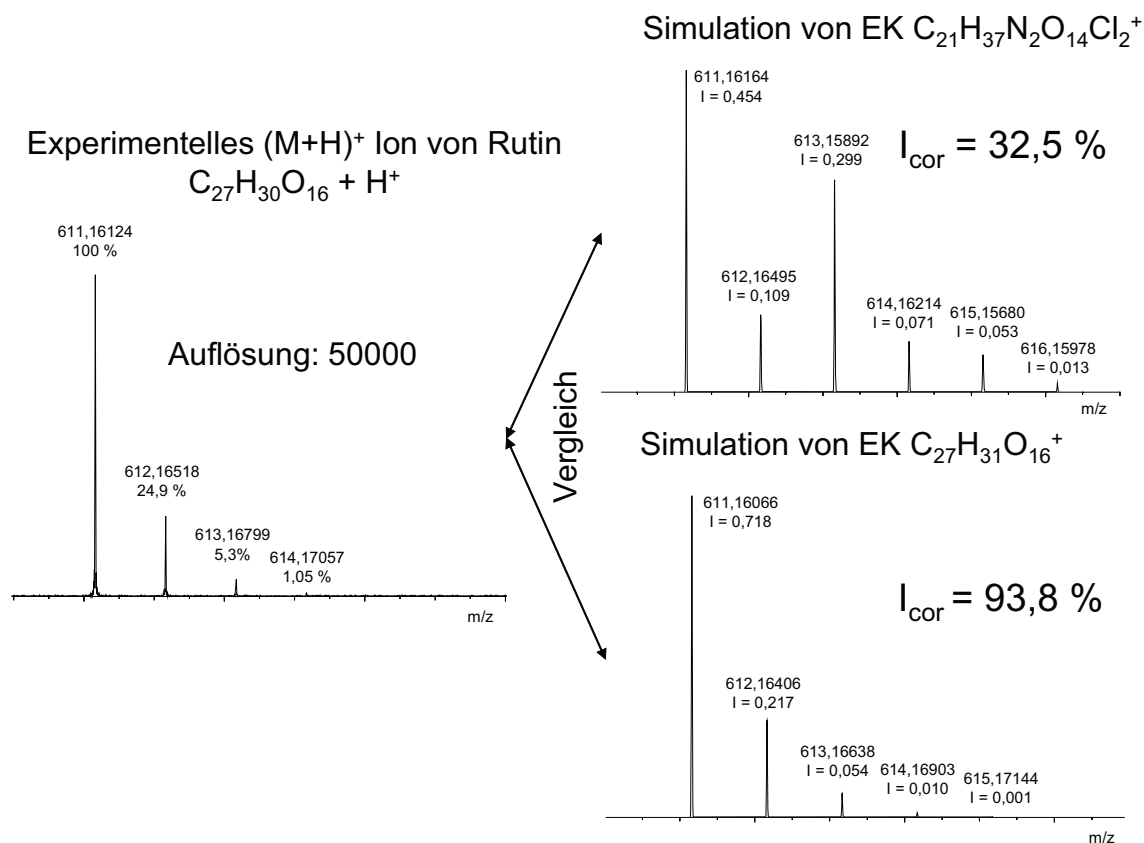


Abbildung 3.10: Prinzip des Muster-Vergleichs („Pattern Matching“) bei der Isotopenmusteranalyse. Links ist der Ausschnitt eines experimentellen Spektrums abgebildet, der das Isotopenmuster des Molekülions (M+H)⁺ der Substanz Rutin zeigt. Rechts sind die simulierten Muster für zwei EK abgebildet, die der exakten Masse 611,16124 Da im Intervall von +/- 5 ppm aus den Elementen C, H, N, O, Cl und Br zugeordnet werden können.

„Peak Picking“

Erfolgt die Simulation des Isotopenmusters durch die Polynomal- oder die FT-basierte Methode, müssen die resultierenden Isotopenpeaks aus den berechneten Datenpunkten (m_i , I_i) bestimmt werden. Jedes lokale Maximum i , für das $I_{i-1} < I_i < I_{i+1}$ gelten muss, repräsentiert einen Isotopenpeak. Da die tatsächlichen Massen eines Isotopenpeaks in der Regel nicht mit den diskretisierten Massenwerten m_i übereinstimmen, ist es nicht zulässig, die Masse m_i eines lokalen Maximums als Masse des Isotopenpeaks und die Intensität I_i als dessen Intensität zu verwenden.

Im Bereich einer Signalspitze kann die Hüllfunktion in guter Näherung durch eine Parabel beschrieben werden, vgl. Abbildung 3.11.

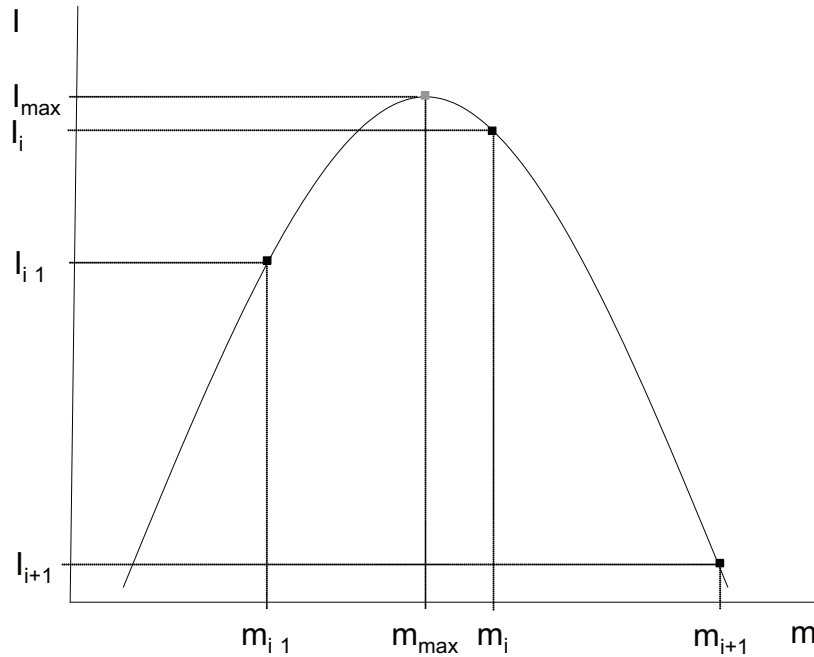


Abbildung 3.11: Interpolation des Peakverlaufes im Bereich eines lokalen Maximums um die drei Datenpunkte (m_{i-1}, I_{i-1}) , (m_i, I_i) und (m_{i+1}, I_{i+1}) durch eine Parabel. Der Punkt (m_{\max}, I_{\max}) ist der globale Extremwert der Parabel und repräsentiert die tatsächliche Position der Signalspitze.

Deshalb wird die genaue Position des Isotopenpeaks durch Interpolation des Peakverlaufes mit einem Polynom zweiten Grades, das die drei Punkte (m_{i-1}, I_{i-1}) , (m_i, I_i) und (m_{i+1}, I_{i+1}) durchläuft, bestimmt (Newtonsche Interpolationsformel für ein Polynom zweiten Grades [155]).

$$I(m) = a_0 + a_1(m - m_{i-1}) + a_2(m - m_{i-1})(m - m_i) \quad (3.43)$$

Durch Einsetzen der drei Punkte eines lokalen Maximums und Lösung des resultierenden Gleichungssystems können die Koeffizienten a_0 , a_1 und a_2 bestimmt werden. Die exakte Position der Signalspitze $(m_{\max}, I(m_{\max}))$ ist durch das globale Maximum der Parabel definiert und kann mit Gleichung (3.44)

$$I'(m) = 0 \quad (3.44)$$

ermittelt werden. Man erhält für m_{\max}

$$m_{\max} = m_i - 0,5 \frac{(m_i - m_{i-1})^2 (I_i - I_{i+1}) - (m_i - m_{i+1})^2 (I_i - I_{i-1})}{(m_i - m_{i-1})(I_i - I_{i+1}) - (m_i + m_{i+1})(I_i - I_{i-1})} \quad (3.45)$$

und für $I(m_{\max})$

$$I(m_{\max}) = I_{i-1} + \frac{(I_i - I_{i-1})}{(m_i - m_{i-1})} (m_{\max} - m_{i-1}) + \frac{[(I_{i+1} - I_{i-1})(m_i - m_{i-1}) - (I_i - I_{i-1})(m_{i+1} - m_{i-1})]}{(m_{i+1} - m_{i-1})(m_{i+1} - m_i)(m_i - m_{i-1})} (m_{\max} - m_{i-1})(m_{\max} - m_i) \quad (3.46)$$

Diese Berechnung wird für jedes lokale Maximum in den Datenpunkten durchgeführt und die berechneten Maxima in die Peakliste des simulierten Musters eingetragen.

Das analytische Maß für die Übereinstimmung von simulierten und experimentellen Isotopenmustern bzw. die Korrelation der Intensitäten I_{cor} ergibt sich aus dem durchschnittlichen relativen quadratischen Fehler zwischen den experimentellen Intensitäten $I_S(i)$ und den theoretisch vorhergesagten Intensitäten $I_P(i)$ eines Musters, normiert auf 100% [195].

$$I_{\text{cor}} [\%] = \left(1 - \left(\frac{\sum_i (\alpha^{-1} I_S(i) - I_P(i))^2}{\sum_i I_P(i)^2} \right)^{0.5} \right) \cdot 100\% \quad (3.47)$$

Ist das simulierte Muster mit dem experimentellen Muster identisch, ergibt sich eine maximale Korrelation von 100%.

Der Parameter α aus obiger Gleichung ist ein Normalisierungsfaktor, der die experimentellen Intensitäten in einer Weise auf die simulierten Intensitäten skaliert, dass die Summe der quadratischen Fehler zwischen den spektralen und den simulierten Intensitäten σ^2 minimal wird. Diese Skalierung dient dazu, die

experimentellen, relativen oder absoluten Intensitätswerte²⁵ zu normieren, um sie mit den simulierten Werten vergleichen zu können.

$$\sigma^2 = \sum_i (I_S(i) - \alpha I_P(i))^2 \quad (3.48)$$

Durch Ableiten von σ^2 nach α und lösen der Gleichung für $\sigma'^2(\alpha) = 0$ erhält man den folgenden Ausdruck für den Normalisierungsfaktor α :

$$\alpha = \frac{\sum_i I_S(i) I_P(i)}{\sum_i I_P(i)^2} \quad (3.49)$$

EK mit einer Intensitätskorrelation unter einem Schwellwert I_{cormin} besitzen keine akkurate spektrale Repräsentation im Massenspektrum und können als gültige EK ausgeschlossen werden. Je näher I_{cormin} am Maximalwert von 100% liegt, desto mehr EK werden ausgeschlossen (vgl. Tabelle 3.7). Jedoch muss bei der Wahl von I_{cormin} darauf geachtet werden, dass die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der experimentellen Intensitätswerte vom verwendeten Analysortyp des Massenspektrometers abhängen (vgl. Abschnitt 3.2.3) und I_{cormin} dementsprechend nicht beliebig groß gewählt werden kann.

Tabelle 3.7: Anzahl der EK für das experimentelle Spektrum von Rutin aus Abbildung 3.10 in Abhängigkeit von I_{cormin} . Kombinierte Elemente: C, H, N, O Cl, und Br, Filter, RDB ≥ 0 , $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm.

I_{cormin}	0-75	80	85	90 ^a	95	100
#EK	50	9	6	5	0	0

a) Die Intensitätskorrelation der korrekten EK beträgt 94%.

²⁵ Es spielt keine Rolle, welcher Normierung die experimentellen Intensitäten eines Isotopenmusters unterliegen. Hier kann sowohl mit absoluten Werten (Ion Counts), oder relativen Werten (Basispeak entspricht 100%, größter Isotopenpeak entspricht 100%) gerechnet werden. In den folgenden Ausführungen werden die experimentellen Intensitätswerte aus Gründen der übersichtlicheren Darstellung auf den größten Isotopenpeak eines Musters ($I = 100\%$) normiert.

Ablauf des Isotopenmustervergleichs

Schritt 1: Auswahl der experimentellen Peaks über die exakten Massen der Isotopenpeaks

Für den Vergleich des theoretischen und des experimentellen Musters müssen den Peaks des simulierten Musters die korrespondierenden experimentellen Peaks zugeordnet werden. Dafür wird in einem Massenfenster im experimentellen Spektrum nach Peaks gesucht. Die Position des Massenfensters wird durch die exakte Masse m_i des simulierten Peaks i bestimmt. Die Breite des Massenfensters ist durch die Toleranz der Massenbestimmung $\pm \Delta m_{\text{abs}}$ festgelegt, die zusätzlich mit einem Toleranzfaktor multipliziert werden kann. Bei der Auswahl des korrespondierenden experimentellen Peaks im Massenfenster müssen die folgenden drei Fälle unterschieden werden:

- im Massenfenster befindet sich kein experimenteller Peak
- im Massenfenster befindet sich genau ein experimenteller Peak
- im Massenfenster befindet sich mehr als ein experimenteller Peak

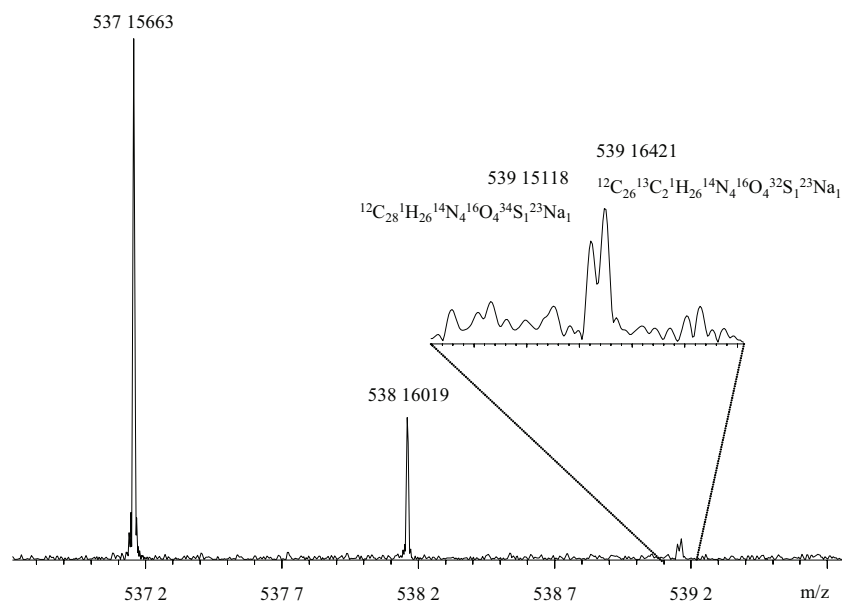


Abbildung 3.12: FTICR-ESI Massenspektrum der Verbindung $(\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_1+\text{Na})^+$ bei einer Auflösung von 60000. Die Vergrößerung der $(M+2)$ -Peaks zeigt die getrennte Darstellung der maßgeblich von Schwefel $^{34}\text{S}_1$ und von Kohlenstoff $^{13}\text{C}_2$ verursachten Isotopenpeaks. Die von Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff verursachten Anteile an den Peaks sind gering und in der Beschriftung vernachlässigt worden.

Im Fall a) wird die spektrale Intensität $I_s(i)$ Null gesetzt und im Fall b) entspricht $I_s(i)$ der Intensität des gefundenen Peaks. Der Fall c) ist für ultrahoch aufgelöste Massenspektren relevant, wenn signifikante isobare Isotopenpeaks, wie zum Beispiel von Schwefel und Kohlenstoff $R^{12}C_{nc}^{34}S_1$ und $R^{13}C_2C_{nc2}^{32}S_1$ getrennt erfasst werden können (Abbildung 3.12) oder wenn mehrere isobare Peaks aufgrund eines Ionengemisches auftreten.

In dieser Situation wird derjenige experimentelle Peak ausgewählt, dessen Masse näher an der theoretischen Masse des simulierten Peaks liegt.

Schritt 2: Bestimmung des Normierungsfaktors

Anschließend wird aus den bestimmten Intensitätsvektoren $I_s(i)$ und $I_p(i)$ der Normierungsfaktor berechnet. In Tabelle 3.8 ist das Ergebnis dieser Berechnung beispielhaft für Rutin dargestellt.

Tabelle 3.8: Auf 100% ($I_s(i)$) und auf die simulierten Intensitäten ($I_s(i)/\alpha$) normierte experimentelle Intensitäten ($I_p(i)$) der Substanz Rutin aus Abbildung 3.10. Die simulierten Intensitäten entsprechen der EK $C_{27}H_{31}O_{16}^+$ aus Abbildung 3.10 links unten.

I	1	2	3	4	5
$I_s(i)$	100	24,9	5,3	1,05	0
$I_p(i)$	0,718	0,217	0,054	0,010	0,001
$\alpha = 137$					
$I_s(i) / \alpha$	0,730	0,182	0,039	0,008	0

Schritt 3: Vergleich von simulierten und experimentellen Mustern unter Berücksichtigung des instrumentellen Rauschens. Ausschlusskriterien und Berechnung der Intensitätskorrelation I_{cor}

Aufgrund des instrumentellen Rauschens in Massenspektren können nur Ionen detektiert werden, deren Intensität über dem Rauschen liegt. Dies muss beim Mustervergleich berücksichtigt werden.

Das Rauschlevel I_{Noise}^* im Massenspektrum sei die minimale Intensität, die ein Ion besitzen muss, um detektiert werden zu können. Die Anzahl der Isotopenpeaks eines experimentellen Musters korrespondiert mit der absoluten Intensität des von einer Ionenspezies im Detektor des Massenspektrometers erzeugten Signals. Je geringer die Intensität eines Ions im Massenspektrum ist, desto mehr Isotopenpeaks gehen im

Rauschen unter und stehen somit für eine Auswertung des Isotopenmusters nicht zu Verfügung.

Die minimale Intensität eines Peaks im simulierten Muster hängt vom gewählten „Pruning“-Wert bei der Isotopenmustersimulation ab. (vgl. 3.2.2). Der „Pruning“-Wert muss, um eine akkurate Simulation zu gewährleisten, um einige Größenordnungen kleiner sein als das normierte Rauschlevel I_{Noise}^{26} .

$$I_{\text{Noise}} = \frac{I_{\text{Noise}}^*}{\alpha} \quad (3.50)$$

Aus diesem Grund werden immer mehr Isotopenpeaks simuliert, als im experimentellen Massenspektrum tatsächlich beobachtet werden können. In Abbildung 3.13 ist zu erkennen, dass der fünfte Isotopenpeak des simulierten Musters von Rutin $(M+H)^+$ unterhalb des instrumentellen Rauschlevels liegt und deshalb im experimentellen Spektrum nicht erscheint.

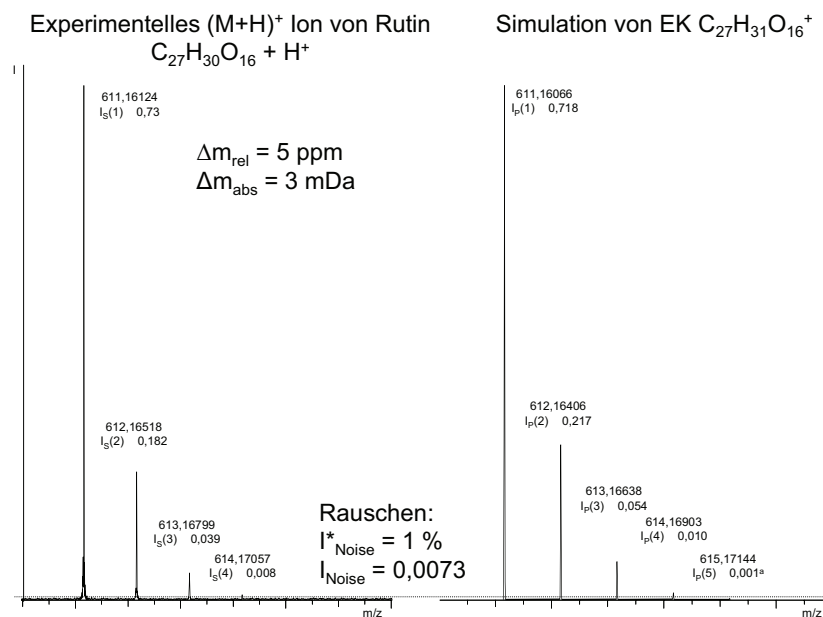


Abbildung 3.13: Gegenüberstellung des experimentellen (links) und des simulierten (rechts) Isotopenmusters von Rutin $(M+H)^+$. Das instrumentelle Rauschen wurde mit einer relativen Intensität von 1% bestimmt. Die auf das simulierte Muster normierte Intensität des Rauschens beträgt 0,0073. ^aMan erkennt, dass der fünfte simulierte Isotopenpeak $(M+5)$ eine Intensität ($I_P(5)$) unter dem „Noise Level“ des Spektrums besitzt und deshalb im experimentellen Spektrum nicht nachgewiesen werden kann.

²⁶ I_{Noise}^* muss in der gleichen Normierung vorliegen wie die experimentellen Intensitäten $I_S(i)$.

Unter Berücksichtigung des spektralen Rauschens I_{Noise} und einer relativen Toleranz bei der Intensitätsbestimmung I_{tol} wird das experimentelle Muster $I_P(i)$ auf das Vorhandensein und Fehlen von simulierten Isotopenpeaks $I_S(i)$ überprüft. Wenn eins der zwei folgenden Ausschlusskriterien zutrifft, wird die betreffende EK als gültige Lösung ausgeschlossen:

- | | | |
|--|-----|--|
| 1. $I_P(i) > I_{\text{Noise}} + I_{\text{Noise}} * I_{\text{tol}}$ | und | $I_S(i) / \alpha < I_{\text{Noise}} - I_{\text{Noise}} * I_{\text{tol}}$ |
| 2. $I_P(i) < I_{\text{Noise}} - I_{\text{Noise}} * I_{\text{tol}}$ | und | $I_S(i) / \alpha > I_{\text{Noise}} + I_{\text{Noise}} * I_{\text{tol}}$ |

Trifft das erste Kriterium zu, dann enthält das simulierte Muster einen Peak der über dem Rauschen liegt, für den aber keine spektrale Repräsentation existiert. Dies wäre zum Beispiel der Fall, wenn die EK des simulierten Musters das Element Schwefel enthält. Das Fehlen des von Schwefel verursachten Isotopenpeaks im experimentellen Muster weist, eine ausreichende Auflösung vorausgesetzt, darauf hin, dass das untersuchte Ion keinen Schwefel enthält. Deshalb ist es richtig, alle EK, welche das Element Schwefel enthalten, auszuschließen.

Kriterium 2 beschreibt die umgekehrte Situation. Die Intensität eines Isotopenpeaks des simulierten Musters liegt im Rauschen, es wird aber ein experimenteller Isotopenpeak erkannt. Dies kann zum Beispiel der Fall sein, wenn die simulierte EK kein Brom enthält und der (M+2)-Peak des simulierten Muster im Rauschen liegt, das spektrale Muster aber einen deutlichen (M+2)-Peak aufweist, da das untersuchte Ion Brom beinhaltet. In diesem Fall ist es angebracht, alle EK, die keinen (M+2)-Peak aufweisen, als gültige EK auszuschließen.

Für jede EK, die von obigen Ausschlusskriterien nicht betroffen ist, wird mit Gleichung (3.47) die Intensitätskorrelation berechnet. Dafür werden nur diejenigen Isotopenpeaks i berücksichtigt, deren simulierte Intensität $I_P(i)$ größer als das Rauschen I_{Noise} ist. EK, die dem dritten Ausschlusskriterium

3. $I_{\text{cor}} < I_{\text{cor min}}$

genügen, werden im letzten Schritt des Vergleichs ausgeschlossen.

Experimentelle Muster mit geringer absoluter Intensität

Die Anwendung von Ausschlusskriterium Eins ermöglicht auch für Ionen, die wegen einer geringen absoluten Intensität im Massenspektrum nur durch den intensivsten Isotopenpeak in Erscheinung treten, bei denen also kein Isotopenmuster nachzuweisen ist, im begrenzten Umfang eine Reduktion der Lösungsmenge durch Beschränkung des Anteils isotopisch relevanter Elemente. Dies trifft für EK zu, bei denen der Anteil eines signifikanten Elementes (Br, Cl, C) so hoch ist, dass simulierte Peaks oberhalb des Rauschens liegen müssen.

Für EK, die das erste Ausschlusskriterium überstehen, wird eine Intensitätskorrelation bestimmt werden, deren Wert nahe 100% liegt, da nur ein Intensitätspaar (I_S , I_P) bei der Berechnung von I_{cor} berücksichtigt werden kann. Die Aussagekraft der Intensitätskorrelation ist allerdings in diesem Fall gering. Aus diesem Grund wird neben der Intensitätskorrelation ein weiteres Bewertungskriterium eingeführt, welches die Aussagekraft der ermittelten Korrelation beschreibt. Hierbei handelt es sich um die Anzahl der interpretierten Peaks eines simulierten Musters n_{intp} für die eine Repräsentation im Massenspektrum gefunden wird, also der simulierten Peaks, die nicht im Rauschen liegen, und deshalb bei der Berechnung der Intensitätskorrelation I_{cor} berücksichtigt werden können. Je mehr experimentelle Peaks durch ein simuliertes Muster interpretiert werden können, desto größer ist auch die Aussagekraft der berechneten Intensitätskorrelation.

Ultrahochaufgelöste Isotopenmuster

Der Vorteil einer ultrahochaufgelösten Messung soll im folgenden Beispiel demonstriert werden. In Abbildung 3.14 ist das Isotopenmuster eines Fragmentes von Rutin abgebildet.

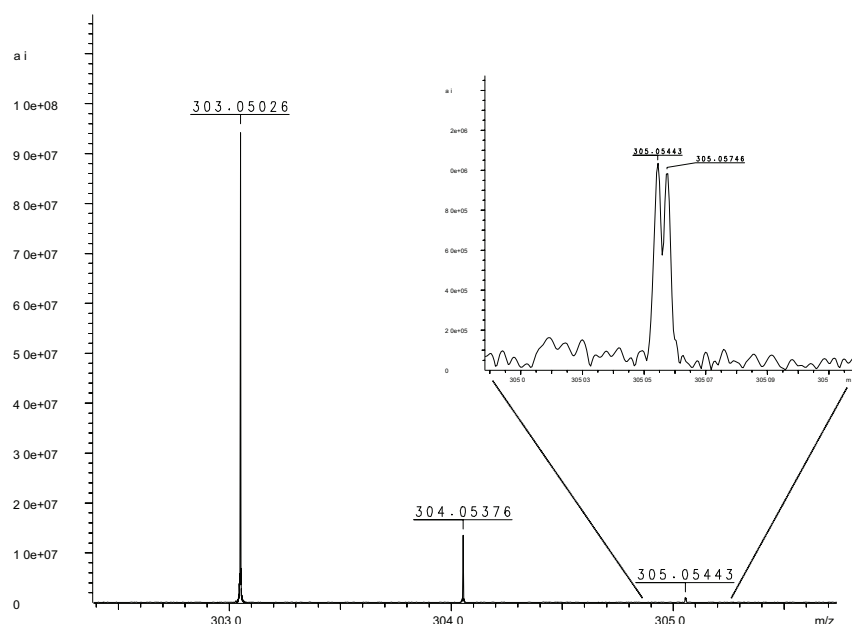


Abbildung 3.14: Experimentelles Isotopenmuster eines Fragmentes von Rutin mit der monoisotopischen Masse von 303,05026 Da. Die Vergrößerung zeigt zwei aufgelöste isobare Isotopenpeaks an der Position (M+2). Der rechte Isotopenpeak des Dubletts wird durch das Sauerstoff-Isotop ^{18}O der linke Peak durch zwei ^{13}C -Isotope im Ion verursacht. Die Auflösung beträgt ca. 120000.

Man erkennt für den zweiten Isotopenpeak (M+2) zwei aufgelöste isobare Isotopenkonfigurationen. Durch Kombination der Elemente C, H, N, O, Cl und Br erhält man für den monoisotopischen Peak acht mögliche Summenformeln. Simuliert man deren Muster mit der Methode aus Abschnitt 3.2.2.3, die alle isobaren Isotopenpeaks zusammenfasst und einheitsaufgelöste Isotopenmuster erzeugt, und vergleicht mit dem experimentellen Muster, verbleiben drei EK mit einer Korrelation von über 85% und jeweils drei interpretierten Peaks. Alle halogenhaltigen EK werden aufgrund einer schlechten Intensitätskorrelation ausgeschlossen (vgl. Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Resultierende EK nach einheitsaufgelöster und hochaufgelöster Simulation des Isotopenmusters und Korrelation mit hochaufgelösten experimentellen Spektrum

EK	Einheitsaufgelöste Simulation ^a		Hochaufgelöste Simulation ^b	
	I_{cor}	n_{intp}	I_{cor}	n_{intp}
$\text{C}_{14}\text{H}_5\text{N}_7\text{O}_2$	95,97	3	NA	3
$\text{C}_{16}\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_3$	94,73	3	NA	3
$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7$	96,74	3	97,36	4

a) Simulation durch diskrete Faltung

b) Polynominal-Methode mit einer Auflösung von 120000

Durch eine hochaufgelöste Simulation werden alle Kombinationen ausgeschlossen, die einen zweiten durch Stickstoff (^{15}N) verursachten isobaren Peak bei (M+1) aufweisen, welcher im Spektrum nicht auftritt, und denen der signifikante durch Sauerstoff (^{18}O) verursachte Isotopenpeak bei (M+2) fehlt. Nur die EK $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7$ erfüllt diese Bedingungen und wird vom Musterfilter nicht ausgeschlossen.

Neben einer ausreichenden Auflösung zur Auftrennung isobarer Isotopenkonfigurationen ist in diesem Beispiel auch eine hohe absolute Intensität des monoisotopischen Peaks notwendig, um den von Sauerstoff verursachten Peak bei (M+2) nachweisen zu können, da die Auftrittswahrscheinlichkeit des ^{18}O Isotops relativ gering ist (0,2%) und dieser Peak nur in intensiven Mustern oder bei Verbindungen mit einem hohem Sauerstoffanteil nachzuweisen ist.

3.4. Auswertung von Massenspektren

3.4.1. Identifizierung von Molekülonen

Die wichtigsten Ionen für die Interpretation von Massenspektren sind die Molekülonen. Sie dienen zur Bestimmung der EK einer untersuchten Verbindung und ermöglichen die Auswertung von Gemischen. Für die Identifizierung von Molekülonen in Massenspektren können verschiedene von der Ionisierung abhängige Regeln aufgestellt werden, die in den folgenden zwei Abschnitten erläutert werden.

3.4.1.1. Identifizierung von Molekülonen in fragmentierungsarmen Ionisierungsmethoden

In fragmentierungsarmen Ionisierungsmethoden, wie ESI, APCI und MALDI, treten Molekülonen häufig in mehrfacher Form durch die Bildung von Addukt- und Clusterionen in Erscheinung (vgl. Abschnitt 2.1.1). Bei positiver Ionisierung wird oft gleichzeitig ein $(\text{M}+\text{H})^+$, ein $(\text{M}+\text{Na})^+$ und ein $(\text{M}+\text{K})^+$ oder die Clusterbildung mit Lösungsmittel- oder Matrixionen beobachtet. Die typischen Massendifferenzen zwischen den einzelnen Adduktionen können zur Identifizierung eines Moleküllions herangezogen werden. So beträgt die Massendifferenz zwischen einem $(\text{M}+\text{H})^+$ - und einem $(\text{M}+\text{Na})^+$ -Addukt genau 21,981945 Da. Treten unter Berücksichtigung der Massengenauigkeit zwei Peaks mit dieser Massendifferenz im Spektrum auf, dann können beide Peaks als Adduktionen desselben Moleküls und demzufolge als Molekülonen identifiziert werden. In Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 sind häufig zu

beobachtende Cluster- und Adduktionen eines Moleküls bei positiver und negativer Ionisierung dargestellt.

Tabelle 3.10: Häufig beobachtete Molekülionen in positiver ESI, APCI, und MALDI [195]

Addukt- oder Clusterion ^a	Ladung z	Ionenmasse ^b	Gewicht
$M + 3H^+$	+3	$M/z + 3/z$	1,5
$M + 2H^+ + Na^+$	+3	$M/z + 25/z$	1,0
$M + H^+ + 2Na^+$	+3	$M/z + 47/z$	1,0
$M + 3Na^+$	+3	$M/z + 69/z$	1,0
$M + 2H^+$	+2	$M/z + 2/z$	1,5
$M + H^+ + NH_4^+$	+2	$M/z + 19/z$	1,0
$M + H^+ + Na^+$	+2	$M/z + 24/z$	1,0
$M + H^+ + K^+$	+2	$M/z + 40/z$	1,0
$M + ACN + 2H^+$	+2	$M/z + 43/z$	1,5
$M + 2Na^+$	+2	$M/z + 46/z$	1,0
$M + 2ACN + 2H^+$	+2	$M/z + 84/z$	1,5
$M + 3ACN + 2H^+$	+2	$M/z + 125/z$	1,5
M^+	+1	M	2,0
$M + H^+$	+1	$M + 1$	2,0
$M + Na^+$	+1	$M + 23$	2,0
$M + K^+$	+1	$M + 39$	2,0
$M + CH_3OH + H^+$	+1	$M + 33$	1,0
$M + ACN + H^+$	+1	$M + 42$	2,0
$M + ACN + Na^+$	+1	$M + 64$	2,0
$M + DMSO + H^+$	+1	$M + 79$	2,0
$M + 2ACN + H^+$	+1	$M + 83$	2,0
$2M + H^+$	+1	$2M + 1$	1,5
$2M + NH_4^+$	+1	$2M + 18$	1,5
$2M + Na^+$	+1	$2M + 23$	1,5
$2M + K^+$	+1	$2M + 39$	1,5
$2M + ACN + H^+$	+1	$2M + 42$	1,0
$2M + ACN + Na^+$	+1	$2M + 64$	1,0

a) M ist das Molekül, ACN ist Acetonitril und DMSO ist Dimethylsulfoxid

b) M ist die Molekülmasse. Es sind nur die nominellen Ionenmassen dargestellt.

Tabelle 3.11: Häufig beobachtete Molekülionen in negativer ESI, APCI, und MALDI [195]

Addukt- oder Clusterion ^a	Ladung z	Ionenmasse ^b	Gewicht
$M - 3H^+$	-3	$M/z - 3/z$	1,0
$M - 2H^+$	-2	$M/z - 2/z$	1,5
$M - H^+$	-1	$M - 1$	2,0
M^-	-1	M	2,0
$M + Na^+ - 2H^+$	-1	$M + 21$	1,5
$M + Cl^-$	-1	$M + 35$	1,5
$M + K^+ - 2H^+$	-1	$M + 37$	1,5
$M + FA - H^+$	-1	$M + 45$	2,0
$M + HAc - H^+$	-1	$M + 59$	1,0
$M + Br^-$	-1	$M + 79$	1,0
$M + TFA - H^+$	-1	$M + 113$	2,0
$2M - H^+$	-1	$2M - 1$	1,5
$2M + FA - H^+$	-1	$2M + 45$	1,5
$2M + HAc - H^+$	-1	$2M + 59$	1,0
$3M - H^+$	-1	$3M - 1$	1,0

a) M ist das Molekül, FA ist Ameisensäure (*formic acid*), HAc ist Essigsäure (*hydrogen acetate*) und TFA ist Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*)

b) M ist die Molekülmasse. Es sind nur die nominellen Ionenmassen dargestellt

Zur Bestimmung der Molekülionen in einem Massenspektrum wird für jeden Peak angenommen, dass er ein Addukt- oder Clusterion aus Tabelle 3.10 oder Tabelle 3.11 ist. Die Masse des M^+ - bzw. M^- -Ions wird entsprechend des angenommenen Adduktes berechnet. Anschließend wird unter Berücksichtigung der Massengenauigkeit nach Peaks gesucht, deren Massenunterschied zur Masse $M^{+/-}$ auf ein zweites Cluster- oder Adduktion hinweist. Werden passende Peaks gefunden, kann der Peak als mögliches Molekülion markiert werden. Da unbekannt ist, um welches Cluster- oder Adduktion es sich bei dem untersuchten Peak handelt, müssen alle möglichen Cluster- und Adduktionen für den auszuwertenden Peak angenommen und die Suche nach passenden weiteren Spezies des Molekülions entsprechend oft wiederholt werden. Kommen für einen Peak mehrere Interpretationen in Frage, wird diejenige Interpretation gewählt, deren Gewichtssumme (vgl. Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11) am größten ist.

Das Ergebnis der Auswertung für den Peak bei 611,16127 Da (Wasserstoffadduktion von Rutin) aus Abbildung 3.15 ist für drei beispielhaft angenommene Molekülionen in Tabelle 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12: Bestimmung von Molekülionen am Beispiel eines Peaks eines Spektrums von Rutin

Angenommenes Molekülion für Peak 611,16127	Gesuchtes Molekülion			
	Masse M^+	$(M+H)^+$	$(M+Na)^+$	$(M+K)^+$
		$M^+ + 1,007825 \text{ Da}$	$M^+ + 22,98977 \text{ Da}$	$M^+ + 38,96371 \text{ Da}$
$(M+H)^+$	610,15345	-	✓	✓
$(M+Na)^+$	588,17150	X	-	X
$(M+K)^+$	572,19756	X	X	-

Man erkennt, dass bei Annahme eines protonierten Molekülions für den Peak bei 611,16127 Da zwei Peaks im Spektrum gefunden werden, die den Adduktionen $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$ entsprechen. Bei der Annahme einer falschen Molekülionspezies für den betrachteten Peak können keine weiteren Molekülionspezies zugeordnet werden. Damit ein Molekülion auf diese Weise korrekt identifiziert werden kann, müssen mindestens zwei der in Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 dargestellten Spezies des Molekülions im Massenspektrum auftreten. Da dies nicht immer der Fall ist, kann für einen Peak, der nicht als Molekülion identifiziert werden kann, nicht zwingend geschlossen werden, dass der Peak keine Spezies eines Molekülions repräsentiert.

3.4.1.2. Identifizierung von Molekülionen in fragmentierungsreichen Ionisierungsmethoden

Die Identifizierung eines Molekülions in EI-Massenspektren lässt sich nicht mit letzter Sicherheit durchführen. Durch zu starke Fragmentierung kann das Molekülion im Spektrum fehlen. Des Weiteren kann das Vorliegen eines Gemisches die Bestimmung des Molekülions erschweren. Es lassen sich einige empirische Regeln aufstellen, die die Identifizierung des Molekülions einer reinen Substanz erleichtern können [1]:

- Das Molekülion ist, sofern im Spektrum nachweisbar, das Ion mit der größten Masse.
- Das Molekülion muss alle Elemente enthalten, die auch in den Fragmenten auftreten (vgl. Kapitel 3.4.3.1).
- Alle Fragmente müssen sinnvolle Massendifferenzen zum Molekülion haben. Massendifferenzen zwischen (M-3) bis (M-13) Da und (M-21) bis (M-25) Da

treten praktisch nicht auf. Sind solche Differenzen zu beobachten, dann handelt es sich entweder um ein Stoffgemisch oder aber beim betrachteten Peak nicht um das Molekülion.

Zur Überprüfung eines vermuteten Molekülions bei Elektronenstoßionisation wird in vielen Fällen auf eine weitere fragmentierungsärmere Ionisierungsmethode (CI, ESI, FAB etc.) zurückgegriffen.

3.4.2. Mehrfachgeladene Ionen

Während bei den meisten Ionisierungsmethoden bevorzugt einfach positiv bzw. negativ geladene Ionen gebildet werden, neigt die ESI mit zunehmender Molekülgröße dazu, mehrfach geladene Ionen zu erzeugen. Da in einem Massenspektrometer das Masse-Ladungsverhältnis gemessen wird, hat die Ladung eines Ions direkten Einfluss auf das Messergebnis. Je größer die Ladungszahl z eines Ions ist, desto kleiner wird das detektierte Masse-Ladungsverhältnis m/z . Ein doppelt geladenes Ion wird demzufolge beim halben Masse-Ladungsverhältnis des einfach geladenen Ions detektiert werden. Mehrfach geladene Ionen sind im Massenspektrum an den reduzierten Abständen ihrer Isotopenpeaks zu erkennen. Bei einem doppelt geladenen Ion halbieren sich die Abstände der Isotopenpeaks, bei einem dreifach geladenen Ion betragen die Abstände nur ein Drittel, verglichen mit dem einfach geladenen Ion. Dieser Zusammenhang findet in Dekonvolutionsalgorithmen Verwendung, deren Aufgabe es ist, alle mehrfach geladenen Ionen eines Massenspektrums in ihren einfach geladenen Zustand zu überführen, um dadurch die nachfolgende Interpretation zu erleichtern [196-202]. Die beschriebene Implementation ist zurzeit nicht in der Lage mehrfach geladene Ionen eines Massenspektrums auszuwerten. Darum ist es notwendig Spektren, in denen keine auswertbare einfach geladenen Spezies eines Ions auftritt, vor der Auswertung einer Dekonvolution zu unterziehen. Dieser Prozessierungsschritt kann oft mit dem Aquisitionsprogramm eines Massenspektrometers durchgeführt werden. Daneben gibt es eine Reihe von frei erhältlichen Programmen die verschiedene Dekonvolutionsalgorithmen zur Verfügung stellen [203-205].

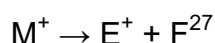
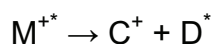
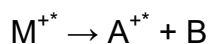
3.4.3. Auswertung von Fragmenten – Fragment-Analyse

Die Fragmentionen einer Verbindung stellen in Massenspektren neben dem Molekülion eine zweite wichtige Informationsquelle zur Bestimmung der EK einer Verbindung und deren struktureller Eigenschaften dar. Es gibt in der Literatur eine Vielzahl an Beispielen, in denen Fragmente zur Charakterisierung von Verbindungen genutzt werden. Beispielhaft seien an dieser Stelle die Sequenzierung von Peptiden und Nukleotiden [18, 206, 207], die Untersuchung von Metaboliten [208, 209], oder die Identifizierung von Karbohydraten und Glykanen [210-212] angeführt.

Fragmentionen treten in Massenspektren bei der Verwendung geeigneter Ionisierungstechniken, speziell der Elektronenstoßionisation auf, können aber auch mit fragmentierungsarmen Ionisierungsmethoden gezielt erzeugt werden. Dazu werden spezielle Techniken eingesetzt, bei denen die Ionen im Analysator Bereiche durchlaufen, in denen sie aufgrund spezieller Bedingungen energetisch angeregt werden und darauf folgend in einer Reihe von Fragmentierungsreaktionen in kleinere Bruchstücke zerfallen können. Erfolgt die Anregung durch den Zusammenstoß mit gezielt in das Vakuum eingebrachten neutralen Molekülen, spricht man von kollisionsinduzierter Dissoziation (*Collision Induced Dissociation*, CID) [213]. Als Kollisionsgas werden reaktionsträge Gase, wie Argon, N₂ oder CO₂, in den Kollisionsraum des Massenspektrometers eingelassen. CID stellt die am häufigsten verwendete Methode in Tandem-MS- bzw. MSⁿ-Experimenten dar, für die eine gezielte Fragmentierung ausgewählter Ionen charakteristisch ist. Die Anregung kann auch durch den Beschuss des Ionenpaketes mit einem Infrarot-Laser erfolgen. Hierbei handelt es sich um Infrarot Multi Photonen Dissoziation (*Infrared Multi Photon Dissociation* IRMPD). IRMPD zeichnet sich genauso wie eine weitere Methode, der Elektroneneinfang Dissoziation (*Electron Capture Dissociation*) [214], durch die Möglichkeit aus, den eingebrachten Energiebetrag durch Wahl der Laserenergie bzw. des Elektronenpotenzials gezielt steuern zu können. Deshalb finden diese beiden Methoden hauptsächlich bei der Analyse empfindlicher Biopolymere Verwendung [215-217]. In ESI-, APCI- und AP-MALDI-Quellen ist es auch möglich, Ionen direkt zu fragmentieren. Bei diesen Quellen werden die erzeugten Ionen über verschiedenen Druckstufen in den Vakuumbereich überführt, wobei sie ein System von elektrischen Linsen durchlaufen. Durch Erhöhung eines Durchlaufpotenzials an geeigneter Stelle, meist wird dazu der Bereich zwischen dem Auslass der Transferkapillare und der ersten Skimmerlinse gewählt, werden die Ionen zu

Zusammenstößen mit Lösungsmittel- und Stickstoffmolekülen (Trockengas) angeregt, die in diesem Bereich aufgrund des relativen hohen Druckes noch in ausreichender Zahl vorhanden sind. Bei dieser Art der Fragmentierung spricht man von ESI-CID oder *In-Source*-CID [218].

Die Art der ablaufenden Fragmentierungsreaktionen und der gebildeten Fragmenten hängt im Detail stark von der gewählten Dissoziationsmethode ab [218, 219]. Für einen umfassenden Einblick sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen, in der besonders die EI Berücksichtigung findet [28, 77]. Die ablaufenden Reaktionen, bei denen es sich immer um Reaktionen von Ionen in der Gasphase handelt, lassen sich jedoch verallgemeinern [1]:



M^+ stellt hierbei das Mutterion einer Fragmentierungsreaktion dar, A^{+*} , C^+ und E^+ seien die nach der Reaktion detektierbaren Tochterionen, B , D^* und F sind die entstehenden Neutralverluste NV, die infolge ihres ungeladenen Zustands nicht nachzuweisen sind. Der $*$ kennzeichnet eine Radikalstelle, also Ionen oder Moleküle mit einem ungepaarten Bindungselektron das $^+$ die Ladung²⁸.

3.4.3.1. Beziehung zwischen Mutter- und Tochterionen

Für die dargestellten Reaktionen lassen sich einige Regeln aufstellen, die für die weiteren Betrachtungen von Relevanz sind:

1. Die Masse von Tochterionen ist kleiner als die des Mutterions.
2. Die Differenz der EK von Mutter- und Tochterionen muss einen chemisch plausiblen Neutralverlust NV ergeben.
3. Die Summe der Massen von Tochterion und NV ergibt die Masse des Mutterions.

²⁷ Stevensche Regel [220].

²⁸ Die positiven Ladungen können durch negative Ladungen ausgetauscht werden.

3.4.3.2. Beziehung zwischen Molekül- und Fragmentionen - Konsistenztest

Überträgt man diese Regeln auf ein Molekülion und eine Reihe bekannter Fragmente dieses Ions, dann repräsentiert das Molekülion das Mutterion und die Fragmente Tochterionen, die in unterschiedlichen Fragmentierungsreaktionen entstehen können. Die Bestimmung und Auswertung der Beziehungen zwischen dem Molekülion und bekannten Fragmentionen kann zur weiteren Reduktion der EK des Molekülions genutzt werden. Dafür werden aus der Massendifferenz zwischen dem Molekülion und einem Fragment die EK des Neutralverlustes bestimmt. Auch der Neutralverlust muss chemisch sinnvolle EK mit einem RDB-Äquivalent größer oder gleich Null besitzen. Für jede EK_M des Molekülions wird anschließend nach einer Kombination von je einer EK_F des Fragmentes und des Neutralverlustes EK_{NV} gesucht, für die die Summe der EK_{F+NV} aus Fragment und Neutralverlust die EK_M des Molekülions ergibt.

$$EK_M = EK_F + EK_{NV}$$

Jede EK_M des Molekülions, für die keine Kombination aus Fragment und Neutralverlust gefunden wird, kann als gültige EK_M des Molekülions ausgeschlossen werden. Dieser Konsistenztest wird mit jedem Fragment wiederholt und auf diese Weise kann die Zahl der dem Molekülion zugeordneten EK_M weiter eingeschränkt werden. Dieses Ausschlussprinzip gilt natürlich in gleicher Weise auch für die EK der Fragmente und Neutralverluste. EK_F des Fragmentes und der EK_{NV} Neutralverluste, für die keine Konsistenz zum Molekülion hergestellt werden kann, sind als gültige EK auszuschließen. Die Beziehung der Fragmente untereinander wird in Abschnitt 3.4.3.3 näher untersucht.

In der Literatur wird die gemeinsame Auswertung von Fragmenten und Molekülionen zur Charakterisierung einer Verbindung an einigen Stellen demonstriert [221, 222] und soll an dieser Stelle am Beispiel von Rutin erläutert werden. Abbildung 3.15 zeigt das vollständige ESI-Massenspektrum von Rutin. Infolge eines erhöhten Durchlaufpotenzials im Quellenbereich, wird die untersuchte Substanz zur Fragmentierung angeregt (*In-Source-CID*). Durch den Vergleich des gering fragmentierten Spektrums (Abbildung 3.15 oben rechts) mit dem fragmentierten Spektrum lassen sich zwei signifikante Fragmente bestimmen, die dem Molekülion

$((M+H)^+$: 611 Da, $(M+Na)^+$: 633 Da, $(M+K)^+$: 649 Da, $(M+Cs)^+$: 743 Da²⁹) zugeordnet werden können.

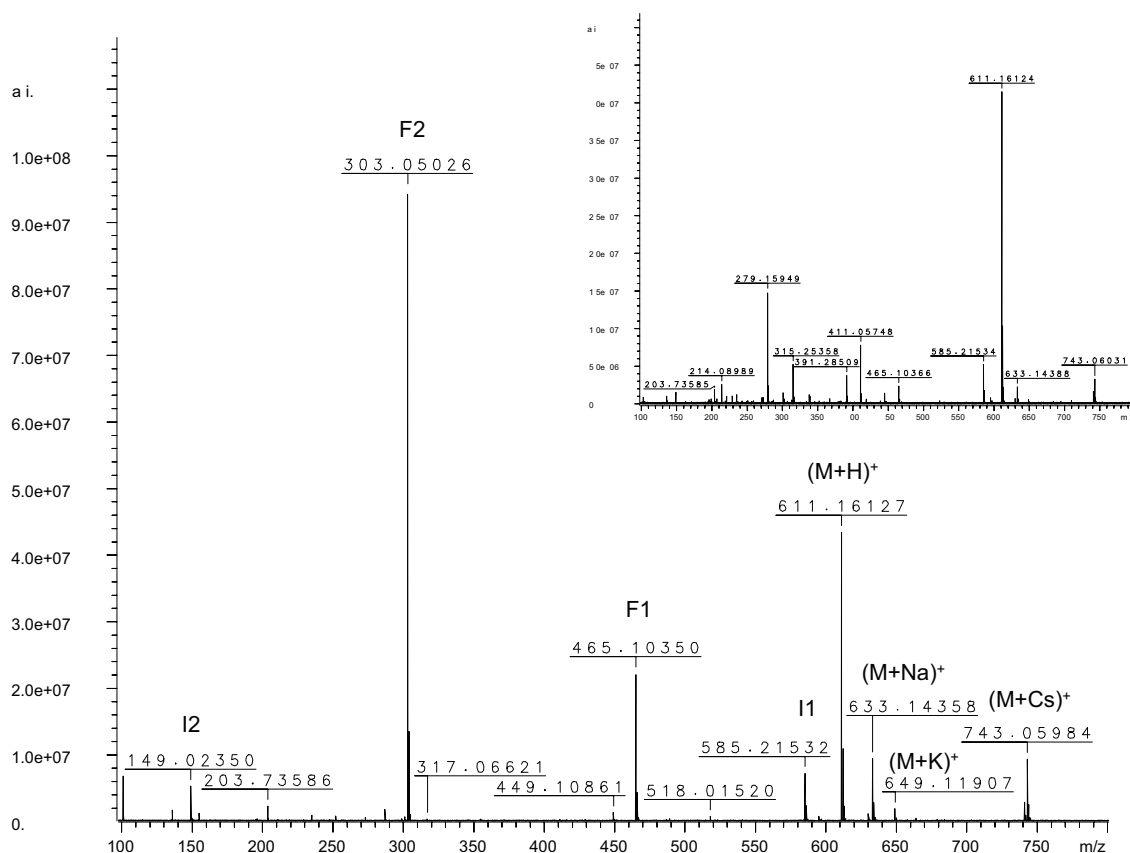


Abbildung 3.15: ESI-FTICR *In-Source*-CID Massenspektrum von Rutin mit einem Fragmentierungspotenzial von 120 V. Der Einsatz oben rechts zeigt ein Spektrum, das mit einem geringeren Fragmentierungspotenzial von 80 V aufgenommen wurde.

Für das $(M+H)^+$ Ion werden unter Berücksichtigung der Elemente C, H, N, O, Cl, und Br, und einer Massengenauigkeit von 5 ppm, sechs mögliche Summenformeln bestimmt.

Tabelle 3.13: Mögliche Summenformeln für das $(M+H)^+$ Ion aus Abbildung 3.15

Nr.	EK _M	Masse [Da]	Δm in [mDa] (ppm)	I _{cor} [%]
1	C ₂₆ H ₁₅ N ₁₈ O ₂	611,16199	-0,72 (-1,2)	93,1
2	C ₂₅ H ₁₉ N ₁₄ O ₆	611,16065	0,61 (1,0)	94,7

²⁹ Die Cs-Addukte resultieren aus einer Verunreinigung des Zuführungssystems der ESI-Quelle mit CsI aufgrund einer vorhergehenden Kalibrierung mit dieser Substanz. Spuren von CsI verbleiben nach einer Kalibrierung im Zuführungssystem des MS und bilden in nachfolgenden Messungen gelegentlich Adduktionen.

Nr.	EK _M	Masse [Da]	Δm in [mDa] (ppm)	I _{cor} [%]
3	C ₂₉ H ₂₃ N ₈ O ₈	611,16334	-2,07 (-3,4)	91,4
4	C ₂₄ H ₂₃ N ₁₀ O ₁₀	611,15932	1,95 (3,2)	96,2
5	C ₂₈ H ₂₇ N ₄ O ₁₂	611,16200	-0,74 (-1,2)	92,8
6	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,16067	0,60 (1,0)	94,1

Durch Bestimmung der EK_F der beiden Fragmente und der EK_{NV} der Neutralverluste, die laut den oben aufgestellten Regeln nur die Elemente enthalten können, die auch im Molekülion vorhanden sind, und dem Vergleich mit den EK_M des Molekülions, kann die Zahl der EK_M die dem Molekülion zugeordnet werden, weiter eingeschränkt werden. Im obigen Beispiel verbleiben die Elemente C, H, N und O für die Neutralverluste und Fragmente. Alle EK mit den Elementen Cl und Br sind vom Isotopenmusterfilter ausgeschlossen worden. Dementsprechend werden die EK für die zwei Fragmente aus den vier verbliebenen Elementen gebildet. In Tabelle 3.14 sind die EK der Fragmente F1 und F2³⁰ angegeben.

Tabelle 3.14: EK_F die den Fragmenten F1 und F2 zugeordnet werden.

Fragment	Nr.	EK _F	Masse [Da]	Δm in [mDa] (ppm)	I _{cor} [%]
F2	1	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303,04993	0,33 (1,1)	97,4
	1	C ₁₉ H ₉ N ₁₄ O ₂	465,10274	0,76 (1,6)	98,1
	2	C ₂₁ H ₁₁ N ₁₁ O ₃	465,10409	-0,56 (-1,3)	96,0
	3	C ₂₃ H ₁₃ N ₈ O ₄	465,10543	-1,93 (-4,2)	93,9
F1	4	C ₁₈ H ₁₃ N ₁₀ O ₆	465,10141	2,09 (4,5)	99,1
	5	C ₂₀ H ₁₅ N ₇ O ₇	465,10275	0,75 (1,6)	96,9
	6	C ₂₂ H ₁₇ N ₄ O ₈	465,10409	-0,59 (-1,3)	94,8
	7	C ₂₄ H ₁₉ N ₁ O ₉	465,10544	-1,94 (-4,2)	92,7
	8	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₁₁	465,10141	2,09 (4,5)	97,7
	9	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,10276	0,74 (1,6)	95,6

Zur Reduktion der dem Molekülion zugeordneten EK_M wird die Konsistenz jedes Fragmentes mit dem Molekülion überprüft. EK_M des Molekülions, für die keine passende Kombination aus einer EK_F des Fragmentes und einer EK_{NV} des Neutralverlustes gefunden wird, deren Summe EK_M ergibt, werden ausgeschlossen. Vergleicht man die EK_F des Fragmentes F2 C₁₅H₁₁O₇ mit den EK_M des Molekülions

³⁰ Zur Bestimmung der EK von F2 siehe Abschnitt 3.3.4.

wird deutlich, dass für die EK_M Nr. 1 (C₂₆H₁₅N₁₈O₂) und die EK_M Nr. 2 (C₂₅H₁₉N₁₄O₆) kein Neutralverlust existieren kann, der zum Fragment F2 führt, denn in diesem sind sieben Sauerstoffatome enthalten, während die beiden EK_M nur zwei bzw. sechs Sauerstoffatome beinhalten. In Tabelle 3.15 sind die EK des Molekülions mit den zugehörigen Paaren aus Neutralverlust und Fragment 2 dargestellt.

Tabelle 3.15: EK_M des Molekülions, EK_{F2} des Fragmentes F2 und dazugehörige EK_{NV} des Neutralverlustes. Für die ersten zwei EK_M des Molekülions existieren keine Neutralverluste zum Fragment F2.

Nr.	EK _M	EK _{NV} ^a	EK _{F2}
1	C ₂₆ H ₁₅ N ₁₈ O ₂	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
2	C ₂₅ H ₁₉ N ₁₄ O ₆	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
3	C ₂₉ H ₂₃ N ₈ O ₈	C ₁₄ H ₁₂ N ₈ O ₁	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
4	C ₂₄ H ₂₃ N ₁₀ O ₁₀	C ₉ H ₁₂ N ₁₀ O ₃	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
5	C ₂₈ H ₂₇ N ₄ O ₁₂	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₅	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
6	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	C ₁₂ H ₂₀ O ₉	C ₁₅ H ₁₁ O ₇

a) Die exakte Masse des Neutralverlustes beträgt 308,111011 Da. Als Massentoleranz wurde die absolute Toleranz bei der Bestimmung des Molekülions $\Delta m_{\text{abs.}} = 3,0$ mDa verwendet. Das Verhältnis von Kohlenstoff- zu den Heteroatomen wurde bei der Bestimmung der EK des Neutralverlustes nicht eingeschränkt.

Die restlichen vier EK_M des Molekülions können durch die berechneten Neutralverluste mit Fragment 2 erklärt werden.

Die Anzahl der EK, die dem Molekülion zugeordnet werden, reduziert sich damit auf vier. Dieser Konsistenztest wird in der gleichen Weise mit Fragment F1 durchgeführt. In diesem Fall kann die Menge der EK_M dadurch nicht weiter reduziert werden.

Mit diesem Beispiel wurde demonstriert, dass es möglich ist, die Anzahl der EK eines Molekülions bzw. eines Mutterions durch Überprüfung der Konsistenz mit den Fragmentationen bzw. den Tochterionen zu reduzieren.

3.4.3.3. Beziehungen zwischen den Fragmentationen einer Verbindung

Von weiterem Interesse bei der Auswertung von Fragmenten sind auch die Beziehungen der Fragmente untereinander. Wenn bestimmt werden kann, welches Fragment aus welchem Fragment entsteht und welches Fragment nicht in Beziehung zu anderen Fragmenten steht, können Fragmentierungspfade konstruiert werden, die

die möglichen Entstehungswege der Fragmente ausgehend vom Mutter/Moleküllion wiedergeben.

In Abbildung 3.16 ist die Fragmentierung einer hypothetischen vieratomigen linearen Verbindung dargestellt, für die alle möglichen Fragmente und Fragmentierungspfade angegeben werden.

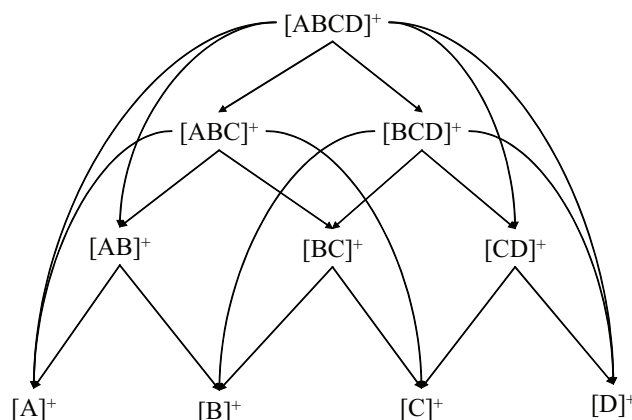


Abbildung 3.16: Hypothetische Fragmentierung eines einfachen vieratomigen linearen Ions. Die Möglichkeit von Umlagerungsreaktion wird nicht berücksichtigt [223].

Ausgehend vom Mutterion $[ABCD]^+$ können die Fragmente $[AB]^+$ und $[CD]^+$ auf direktem Weg durch Aufspaltung der Mutterions entstehen. Dies widerspricht auf den ersten Blick den oben angegebenen Fragmentierungsreaktionen, nach denen zu erwarten ist, dass eines der beiden Reaktionsprodukte ein Neutralverlust und deshalb nicht nachzuweisen ist. Entscheidend dafür, welches Reaktionsprodukt einer Fragmentierungsreaktion die Ladung trägt und damit nachweisbar ist, ist die räumliche Lokalisierung der Ladung auf dem Mutterion. Wenn die Ladung auf dem Mutterion in der Nähe des Elementes A lokalisiert ist, bleibt sie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch nach der Fragmentierung beim Element A, wodurch ein nachweisbares Fragmention $[AB]^+$ und ein ungeladener Neutralverlust $[CD]$ entsteht. Es ist aber durchaus möglich, dass es mehrere Positionen in einer Verbindung gibt, an denen sich die Ladung befinden kann. Das Auftreten von mehrfach geladenen Ionen ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass ein Molekül mehrere Positionen besitzt an denen eine Ladung gebunden werden kann. Da im Massenspektrometer eine

statistisch große Anzahl an Molekülen untersucht wird, ist es möglich, dass beide komplementären Fragmente $[AB]^+$ und $[CD]^+$, deren Summe das Mutterion ergibt, nachweisbar sind, vorausgesetzt, beide Fragmente sind in der Lage, eine Ladung zu tragen.

Die Fragmente $[AB]^+$ und $[CD]^+$ können nicht durch Hinzufügen eines Neutralverlustes ineinander übergeführt werden und sind deshalb nicht konsistent. Eine Inkonsistenz zwischen Fragmenten weist immer auf eine Verzweigung im Fragmentierungspfad hin. Eine Konsistenz zwischen zwei Fragmenten ist notwendige Voraussetzung für den Nachweis, dass ein Fragment aus dem anderen hervorgehen kann. Sie ist aber keine hinreichende Bedingung, denn es kann durchaus eine Konsistenz zwischen zwei Fragmenten bestehen, die nicht auseinander, sondern aus einem übergeordneten Mutterion entstehen oder zu verschiedenen Verbindungen gehören. Dazu sei auf das Ion I2 (149 Da) in Abbildung 3.19 verwiesen. Diesem Ion kann die eindeutige EK $C_8H_5O_3$ zugeordnet und Konsistenz mit dem Molekülion sowie den Fragmenten F1 und F2 nachgewiesen werden. Die MS^n -Untersuchungen in Abbildung 3.18 zeigen jedoch, dass I2 weder direkt aus dem Molekülion noch aus den Fragmenten F1 und F2 entsteht und es sich demzufolge um ein Ion einer anderen Verbindung handelt³¹. Eine nachgewiesene Konsistenz kann deshalb nicht als hinreichender Beweis für einen möglichen Fragmentierungspfad bzw. für eine Verwandtschaft der Ionen gelten.

In Tabelle 3.16 ist das Ergebnis des Konsistenztests zwischen den betrachteten Fragmenten F1 und F2 und dem Ion I2 sowie dem Molekülion des Spektrums aus Abbildung 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.16: Überprüfung der Konsistenz zwischen den Fragmenten F1 und F2, dem Molekülion von Rutin und dem Ion I2

	M	F1	F2	I2
M	-	-	-	-
F1	OK	-	-	-
F2	OK	OK	-	-
I2	OK	OK	OK	-

³¹ Das Ion I2 ($C_8H_5O_3$) ist ein häufig auftretendes Fragment von Weichmachern auf Phthalatbasis, die in vielen Kunststoffen enthalten sind.

Die Konsistenz zwischen dem Molekülion und den Fragmenten (Spalte M) ist die Voraussetzung dafür, dass ein Ion einem Mutterion als Fragment zugeordnet werden kann und wurde in Abschnitt 3.4.3.2 zur Reduktion der EK des Molekülions genutzt. Zusätzlich kann auch zwischen allen Fragmenten eine Konsistenz nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass es im Fragmentierungspfad Verzweigungen geben kann, aber nicht, dass es sie geben muss. Jede Konsistenz stellt einen möglichen Fragmentierungspfad dar. Ausgehend vom Molekülion kommen deshalb verschiedene, in Abbildung 3.17 dargestellte, Entstehungswege für die zwei Fragmente in Frage.

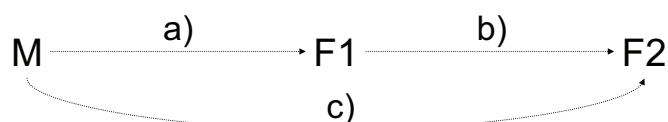


Abbildung 3.17: Mögliche Fragmentierungspfade, die zur Entstehung der Fragmente F1 und F2 führen.

Eine Bestimmung des tatsächlichen Fragmentierungspfades kann nur durch weitere MS^n -Experimente erfolgen. Durch vorherige Isolation des zu fragmentierenden Ions wird sichergestellt, dass alle entstehenden Fragmente dem isolierten Ion zugeordnet werden können und keine explizite Auswahl der zum Mutterion gehörenden Fragmente aus dem Spektrum getroffen werden muss³².

³² Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass sich im isolierten Massenbereich keine weiteren Ionen anderer Verbindungen befinden.

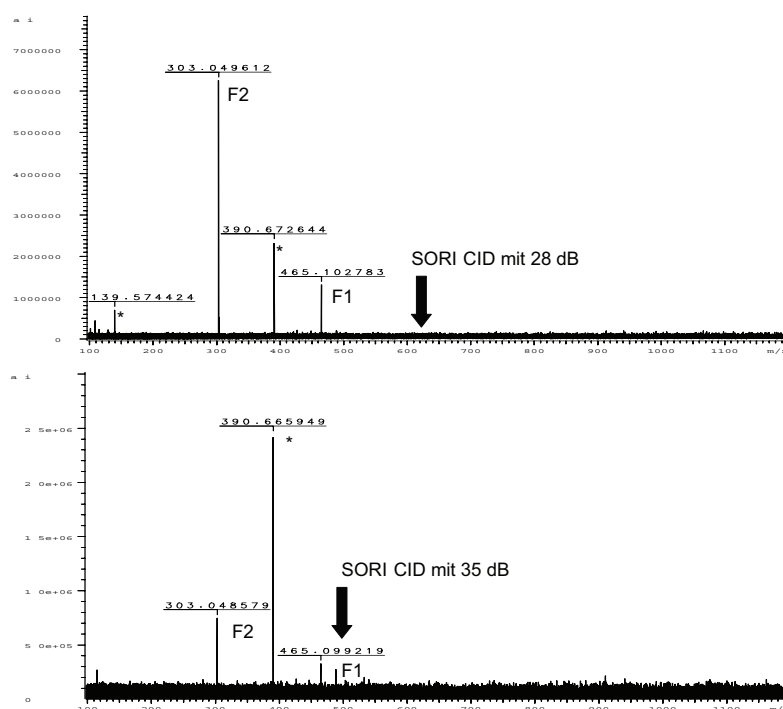


Abbildung 3.18: FTICR-MS²-Spektrum des isolierten Moleküliions M (611 Da) und MS³-Spektrum des isolierten Fragmentes F1 (465 Da) von Rutin. Die Isolation erfolgte mit einem „Sweep“-Impuls. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet. Die mit einem „*“ gekennzeichneten Peaks sind Artefakte, die keinen sinnvollen Massendefekt besitzen.

Es wird deutlich, dass Fragment zwei eine Teilmenge des ersten Fragmentes ist, da F2 im MS³-Spektrum von F1 nachzuweisen ist. Die durch den Konsistenztest vermutete Verwandtschaft der Fragmente kann dadurch experimentell bestätigt und der lineare Fragmentierungspfad (a und b aus Abbildung 3.17) als Entwicklungsweg der Fragmente bestimmt werden. Betrachtet man die Struktur der untersuchten Verbindung, können den Fragmenten in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten Strukturelemente zugeordnet werden.

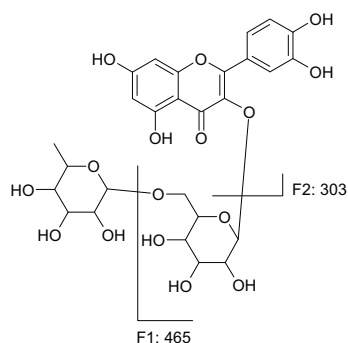


Abbildung 3.19: Zuordnung der nachgewiesenen Fragmente F1 und F2 zu Strukturelementen von Rutin

4. Umsetzung und Implementierung

In den folgenden Abschnitten wird detailliert auf die Realisierung der im Kapitel 3 beschriebenen Algorithmen eingegangen.

Die Implementation erfolgte in den Programmiersprachen C und C++ [224], [225], [226] unter Nutzung der Entwicklungsumgebung Visual C/C++ Version 6.0 und 7.0 der Firma Microsoft. Die Programmiersprache C++ kombiniert die Möglichkeiten der Erzeugung von sehr effizientem, maschinennahem Code mit den Abstraktionsmöglichkeiten einer objektorientierten Programmiersprache und wurde deshalb für die Umsetzung ausgewählt. Für die Erstellung der graphischen Benutzeroberfläche wurde die Sammlung objektorientierter Klassenbibliotheken des „*Microsoft Foundation Class Framework*“ (MFC, Version 4.2) verwendet [227].

4.1. Generierung der Summenformeln

Die Bestimmung der EK eines Peaks bildet die Grundlage für alle weiteren Auswerteprozeduren. In Kapitel 1.1 wurde dargelegt, dass die kombinatorische Generierung der Summenformeln ein Problem mit exponentieller Komplexität darstellt. Eine effiziente Implementierung dieses Algorithmusses ist eine Voraussetzung dafür, auch für Spektren mit einer großen Anzahl von Peaks die Lösungen in einer für den Nutzer akzeptablen Zeit zu generieren.

In Abbildung 4.1 ist der Programmablaufplan der kombinatorischen Summenformelbestimmung dargestellt. Ein Array, dessen Indizes den zu kombinierenden Isotopen zugeordnet sind, wird mit der für jedes Isotop angegebenen minimalen Anzahl (*MinIndex*) initialisiert. Die Isotope ^{12}C und ^1H werden von der Kombination ausgeschlossen, da sie später ergänzt werden und befinden sich nicht im Array. Die laufende Masse (*aktuelle Masse*) wird entsprechend der initialen EK bestimmt. Für jede gültige EK werden, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, die Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff ergänzt. Danach werden die drei in Abschnitt 3.3 dargestellten Filter angewendet. EK, die alle Filterbedingungen erfüllen, werden gespeichert. Die Reduktion gültiger EK durch die Anwendung der Filter vor der Speicherung reduziert den Speicherbedarf. Nach der Validierung einer EK wird eine neue EK durch Inkrementierung des ersten Index (Isotop I_1) erzeugt und die Schleife erneut durchlaufen. Wenn die Masse der neu erzeugten EK größer als die Zielmasse ist oder einer ihrer Indizes den vorgegebenen Grenzwert (*MaxIndex*) überschreitet, tritt ein Überlauf ein. In diesem Fall wird der Index des

aktiven Isotops auf den Startwert zurückgesetzt und der aktive Index um eins erhöht. Wenn der aktive Index dadurch die Anzahl der kombinierten Isotope überschreitet, wurden alle möglichen EK gebildet und die Berechnung kann beendet werden. Ist dies nicht der Fall, wird die Anzahl des neu indizierten Isotops um eins erhöht und dadurch eine neue EK gebildet, welche die Schleife erneut durchläuft.

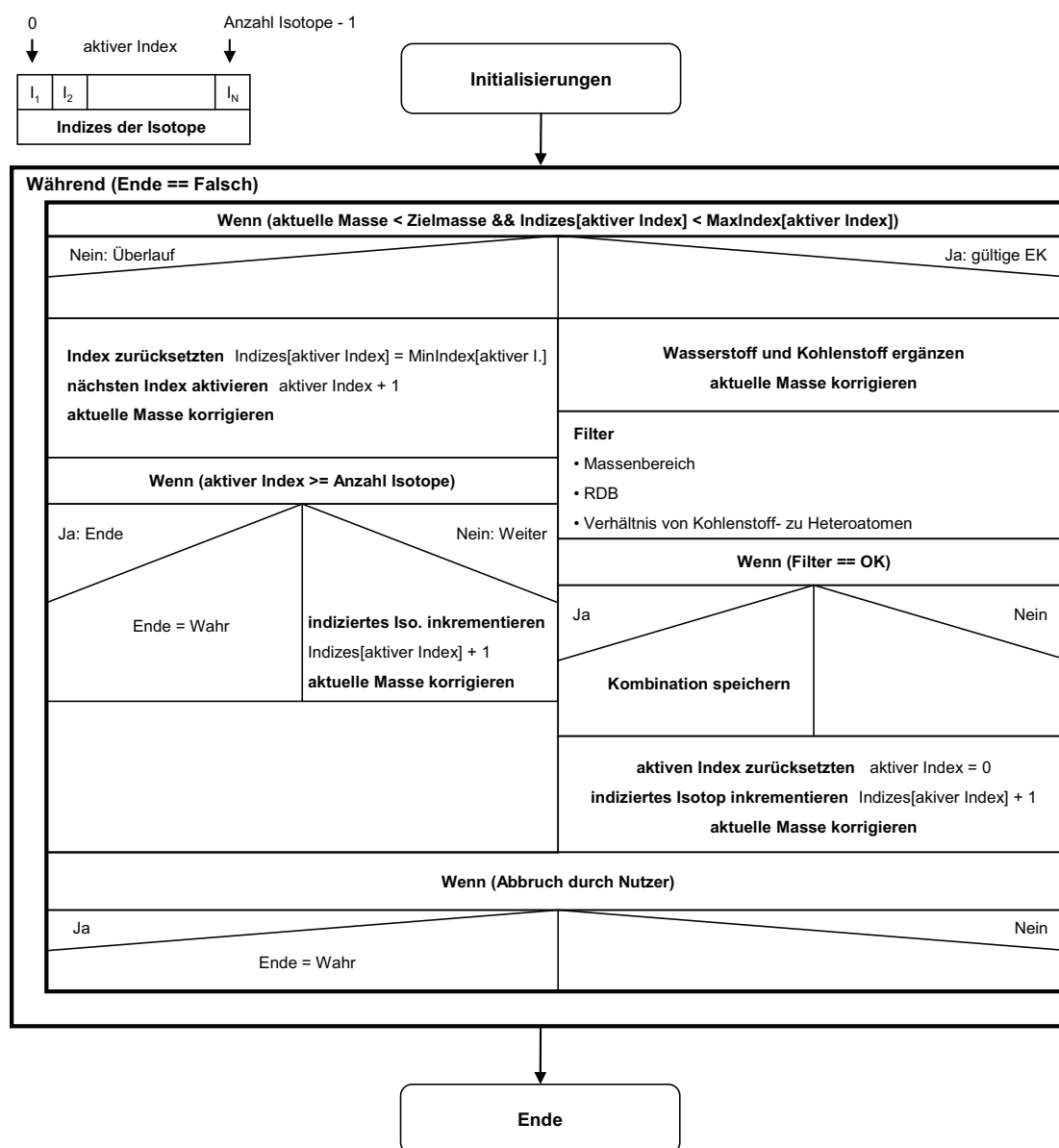


Abbildung 4.1: Programmablaufplan der kombinatorischen Generierung der EK zu einer gegebenen Masse aus einer vorgegebenen Menge an Isotopen. Die exakte Masse, das RDB-Äquivalent und das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Heteroatomen werden schon bei der Erzeugung der EK ausgewertet um den Speicherbedarf zu reduzieren.

Die gesamte Funktionalität der Schleife ist in einer einzigen Methode implementiert, um den zusätzlichen Rechenaufwand der durch Funktionsaufrufe entstehen würde, zu vermeiden.

4.1.1. Laufzeituntersuchung

In der nachfolgenden Tabelle 4.1 sind die Berechnungszeiten einiger Programme zur Bestimmung der EK einer exakten Masse gegenübergestellt. Dabei zeigen sich vor allem zwischen frei erhältlichen „Freeware“- und kommerziellen Programmen deutliche Unterschiede in den Laufzeiten. Die benötigten Zeiten für die Bestimmung der EK zur Masse von 2000 Da lagen in einem Bereich von einigen 100 ms bis über 10 min. Unter den getesteten Programmen gibt es nur ein kommerzielles Programm, dessen Effizienz mit der vorgestellten Umsetzung vergleichbar ist. Weiterhin kann gezeigt werden, dass die Laufzeiten der Berechnungen, bei denen Kohlenstoff und Wasserstoff ergänzt wurden, mit den Berechnungen, bei denen nur Wasserstoff von der Kombination ausgeschlossen wurde, deutlich geringer sind und die rechnerische Bestimmung der Anteile beider Elemente zur Geschwindigkeitssteigerung beiträgt.

Tabelle 4.1: Laufzeiten [s] verschiedener kommerzieller und „Freeware“-Programme sowie der eigenen Implementierung bei der Bestimmung der EK für die Massen 250, 500, 1000, und 2000 Da aus den fünf Elementen C, H, N, O und S.

Programm	250 Da	500 Da	1000 Da	2000 Da
Analyst QS V. 1.1 ^{33, a}	< 1	< 1	< 1	< 1
Eigene Implementierung (Ergänzung von C u H)	< 1	< 1	< 1	0.3
Eigene Implementierung (Ergänzung von H)	< 1	< 1	< 1	1,7
MIDAS - <i>Molecular Formula Calculator</i> ³⁴	< 1	< 1	1	10
Xmass V. 7.0.8 ³⁵	< 1	< 1	3	20
<i>Mass Spec Calculator</i> V. 4.09 ³⁶	< 1	< 1	2	28
MFCalc V. 1.0 ³⁷	< 1	2	20	> 600
AMS 1.0 ³⁸	< 1	2	30	NA

³³ Applied Biosystems/MDS SCIEX, <https://products.appliedbiosystems.com/an/en/US/adirect/ab>

³⁴ National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, <http://magnet.fsu.edu/~midas/>

³⁵ Bruker Daltonics, <http://www.bdal.de>

³⁶ ChemSW, Inc., <http://www.chemsw.com>

³⁷ James Deline, <http://home.pacbell.net/jdeline/>, Freeware

³⁸ Andreas Damrau, Universität Rostock

Programm	250 Da	500 Da	1000 Da	2000 Da
MwtWin V. 6.37 ³⁹	< 1	3	33	> 600
Elemental Composition Calculator ⁴⁰	2	60	> 600	> 600

a) Diese Berechnung erfolgte auf einen PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 3,2 GHz Taktfrequenz und 1 GB RAM. Alle anderen Berechnungen wurden auf einem PC mit AMD Athlon Prozessor, 800 MHz Taktfrequenz und 756 MB RAM durchgeführt.

4.2. Isotopenmusteranalyse

Im Kapitel 3.2.2 wurden drei unterschiedliche Verfahren zur Simulation des Isotopenmusters einer EK vorgestellt. Diese Verfahren unterscheiden sich, in Abhängigkeit von der isotopischen Komplexität (Masse, Anzahl der Elemente) der EK und der gewünschten Auflösung, in ihrer Laufzeit und ihrer Genauigkeit voneinander. Die Auswahl des geeigneten Simulationsverfahrens und dessen Parameter sind kritische Punkte bei der Isotopenmusteranalyse, wenn es darum geht, akkurate Resultate in möglichst kurzer Zeit zu erzielen. An dieser Stelle werden deshalb die vorgestellten und umgesetzten Verfahren in Bezug auf Geschwindigkeit und Genauigkeit der Berechnung und den Einfluss relevanter Parameter untersucht.

4.2.1. Laufzeit- und Genauigkeitsvergleich der Isotopenmuster Simulationsverfahren

Für die vier EK aus Tabelle 4.2 wurden die Isotopenmuster mit den drei in Abschnitt 3.2.2 vorgestellten Methoden simuliert und im Hinblick auf die dafür benötigte Zeit und die erreichte Genauigkeit untersucht. Als Kriterium für die Genauigkeit des berechneten Musters wird die relative Abweichung der Summe der intensitätsgewichteten Massen ($M = \sum_i M_i * I_i$) aller, nach dem „Peak Picking,,

erhaltenen, Isotopenpeaks von der chemischen Masse der EK dargestellt. Die Wahl dieses Kriteriums hat den Vorteil, dass sowohl Diskrepanzen in den simulierten Massen- als auch den Intensitätswerten das Ergebnis beeinflussen und Abweichungen des simulierten Musters indizieren.

³⁹ Matthew Monroe, <http://www.alchemistmatt.com/>, Freeware

⁴⁰ Frank Antolasic, http://www.wsearch.com.au/Tools/elemental_composition_calculator.htm

Tabelle 4.2: Für die Laufzeit- und Genauigkeitsuntersuchungen verwendete EK.

Nr.	EK	Bezeichnung	Monoisotopische Masse [Da]	Chemische Masse [Da]
1	$C_{19}H_{24}N_2$	KML-131-P ^{a)}	280,19395	280,41591
2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Rutin	610,15338	610,52911
3	W_{10}	Wolfram Cluster	1799,46706	1838,49490
4	$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$	Rinder Insulin	5729,60087	5733,60450

a) Syntheseprodukt

Für die Diskretisierung wurde die Anzahl der Datenpunkte für die Signalspitze⁴¹ auf 10 Datenpunkte festgelegt. Die Berechnungen wurden für Auflösungen von 20000 und 100000 durchgeführt⁴².

Polynommethode: Betrachtet man die für die Simulation benötigte Zeit, wird deutlich, dass die Laufzeit mit zunehmender Komplexität der EK⁴³ zunimmt. Je höher die Intensitätsschwelle gewählt wird, desto schneller erfolgt die Berechnung, aber desto ungenauer wird das Ergebnis, da bei einer höheren Intensitätsschwelle weniger Isotopenkonfigurationen im Isotopenmuster berücksichtigt werden.

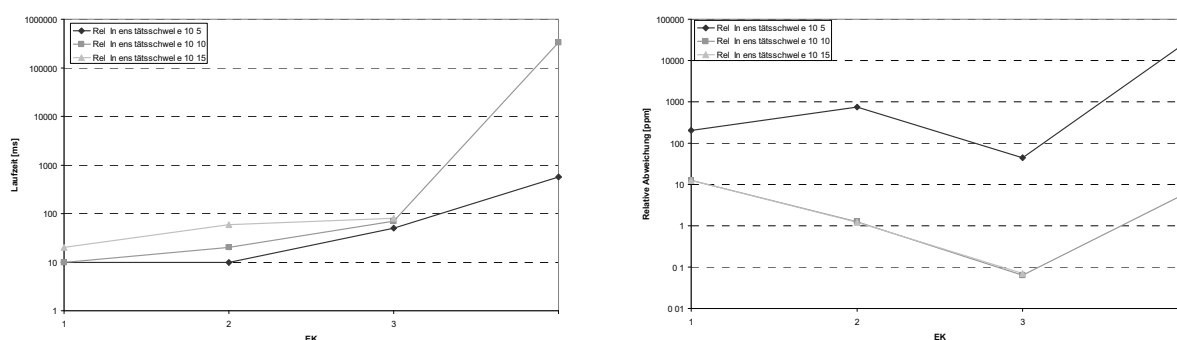


Abbildung 4.2: Laufzeit (links) und relative Abweichung (rechts) der chemischen Masse von der intensitätsgewichteten Summe der Isotopenpeakmassen nach Berechnung der Isotopenmuster durch die Polynommethode für vier EK und mit drei unterschiedlichen relativen Intensitätsschwellen. Bei einer Intensitätsschwelle von 10^{-15} war die Simulation von Rinderinsulin nicht in einer realistischen Zeitspanne möglich.

⁴¹ Massenbereich von $\Delta m_{50\%}$

⁴² Die Auflösung ist für die Methode der Diskreten Faltung nicht relevant. Alle Berechnungen wurden auf einem PC mit P3 Prozessor mit 800 MHz Taktrate und 756 MB Arbeitsspeicher durchgeführt.

⁴³ Die isotopische Komplexität steigt mit der Anzahl der Isotope eines Elementes und der Anzahl der Elemente in der EK und wird durch die nach Glg. (3.13) berechnete Zahl der Isotopenkonfigurationen bestimmt.

Signifikant wird dieser Effekt bei der Simulation des Rinderinsulins, bei dem entweder mit einer relativen Intensitätsschwelle von 10^5 ein stark abweichendes Muster (170 Da) in einer Zeit von 570 ms, oder mit einer geringeren Schwelle von 10^{10} , ein akkurates Ergebnis mit einer Abweichung von 3,8 mDa (6,6 ppm) in ca. 5 Minuten berechnet wird. Bei einer Intensitätsschwelle von 10^{10} sind die simulierten Muster für die ersten drei EK mit einer Abweichung von maximal 10 ppm hinreichend genau und werden in einer Zeit von weniger als 100 ms berechnet. Die gewählte Auflösung hat bei dieser Methode keinen signifikanten Einfluss auf die Laufzeit.

FFT-Methode: Die Laufzeit der FFT-Methode wird durch die Menge der Datenpunkte bestimmt, mit dem der simulierte Massenbereich diskretisiert wird. Diese hängt, wie in Abschnitt 3.2.2.2 erläutert, von der gewählten Auflösung und der Größe des Massenbereiches ab. Bei einer vorgegebenen Auflösung R_{FWHM} muss der Massenbereich bei kleineren Massen m feiner diskretisiert werden, da die Peakbreite $\Delta m_{50\%} = m/R_{FWHM}$ geringer ist und die Anzahl der Datenpunkte im Bereich von $\Delta m_{50\%}$ vorgegeben wird. Darum nimmt die Berechnungszeit bei konstanter Auflösung mit zunehmender Masse ab. Es sei hier angemerkt, dass mit zunehmender Masse auch der zu berücksichtigende Massenbereich ansteigt, da die Isotopenmuster breiter werden und sich damit die Anzahl der Datenpunkte wieder erhöht. Allerdings überwiegt dieser Effekt nur bei EK mit isotoopenreichen Elementen, wie es zum Beispiel für das Wolfram-Cluster nachgewiesen werden kann.

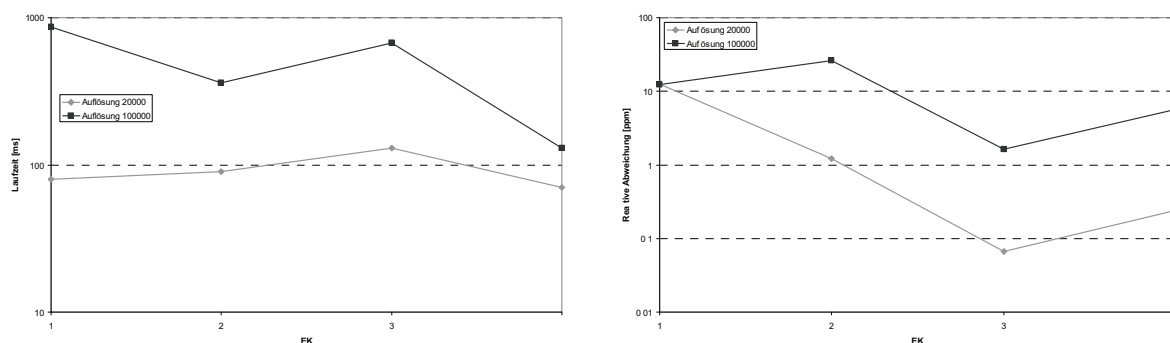


Abbildung 4.3: Laufzeit (links) und relative Genauigkeit (rechts) des Isotopenmuster-Simulationsverfahrens basierend auf dem FFT-Algorithmus für die vier EK aus Tabelle 4.2 mit den Auflösungen 20000 und 100000.

Für die ersten drei EK liegen die Berechnungszeiten deshalb deutlich über denen der Polynominal-Methode. Das isotopisch komplexe Muster von Rinderinsulin kann dagegen in einer signifikant kürzeren Zeit von ca. 100 ms und mit einer Genauigkeit von ca. 10 ppm bestimmt werden. Damit kann gezeigt werden, dass die Verwendung der FFT-Methode für große Moleküle vorteilhaft ist.

Die Abweichungen, aus Rundungsfehlern und der notwendigen Diskretisierung resultierend, sind mit maximal 25 ppm relativ gering und mit denen der Polynominal-Methode bei einer Intensitätsschwelle von 10^{-10} vergleichbar.

Diskrete Faltung: Die Methode der diskreten Faltung erzeugt keine hoch aufgelösten Muster, sondern fasst isobare Isotopenkonfigurationen während der Berechnung zusammen. Dadurch wird die Anzahl der bei der Berechnung zu berücksichtigenden Terme stark eingeschränkt und die Berechnung erfolgt dementsprechend schnell. Die Laufzeit lag für alle Simulationen unabhängig von der verwendeten Intensitätsschwelle unter 10 ms⁴⁴.

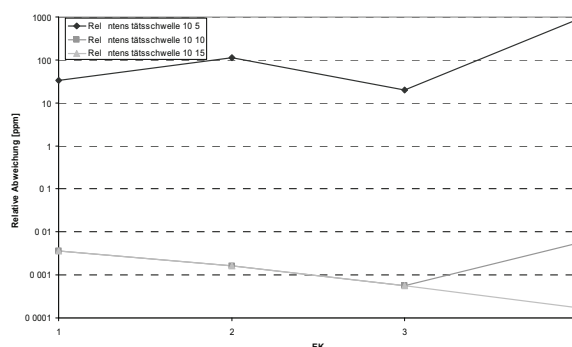


Abbildung 4.4: Relative Abweichung der chemischen Massen von der intensitätsgewichteten Summe der Massen der simulierten Isotopenpeaks bei drei Intensitätsschwellen.

Da die Bestimmung der resultierenden Masse isobarer Isotopenkonfigurationen unter Berücksichtigung ihrer Intensitäten erfolgt, stimmt die Summe der intensitätsgewichteten Massen eines simulierten Musters erwartungsgemäß gut mit der chemischen Masse der EK überein. Einzige Ausnahme hierbei bilden die Berechnungen, die mit der höchsten Intensitätsschwelle von 10^{-5} durchgeführt wurden. Hier zeigen sich, ähnlich wie bei der Polynominal-Methode, deutliche

⁴⁴ Eine genauere Messung der Laufzeit ist aus programmiertechnischen Gründen nicht möglich.

Verzerrungen des simulierten Musters, die auch bei dieser Methode durch den Ausschluss einer großen Zahl an Isotopenkonfigurationen verursacht werden.

4.2.2. Automatische Auswahl des angewendeten Simulationsverfahrens

Wenn die experimentelle Auflösung zu gering ist, um isobare Isotopenkonfigurationen getrennt darzustellen, genügt es, die Simulation des Musters mit der Methode der diskreten Faltung durchzuführen, die nur einen Isotopenpeak pro nomineller Masse erzeugt und einen deutlichen Geschwindigkeitsvorteil gegenüber den anderen Methoden besitzt. Entscheidendes Kriterium für die Wahl zwischen einem hochauflösenden Verfahren und der diskreten Faltung ist die Breite der experimentellen Peaks $\Delta m_{50\%}$ bei halber Peakhöhe, die sich aus der Auflösung R_{FWHM} und der Masse M bestimmen lässt.

Um zwei experimentelle gleichintensive Peaks der Breite $\Delta m_{50\%}$ getrennt erfassen zu können, müssen sich deren Massen um mindestens $\Delta m_{\min} = \Delta m_{50\%}$ unterscheiden, weil andernfalls eine vollständige Überlagerung auftritt und beide Peaks zu einem neuen Peak verschmelzen (vgl. Abbildung 4.5). Wenn demnach die experimentelle Auflösung R den Wert $M/\Delta m_{\min}$ unterschreitet, ist die getrennte Darstellung eines isotopischen Dubletts, dessen Masse sich um Δm_{\min} unterscheidet, nicht möglich.

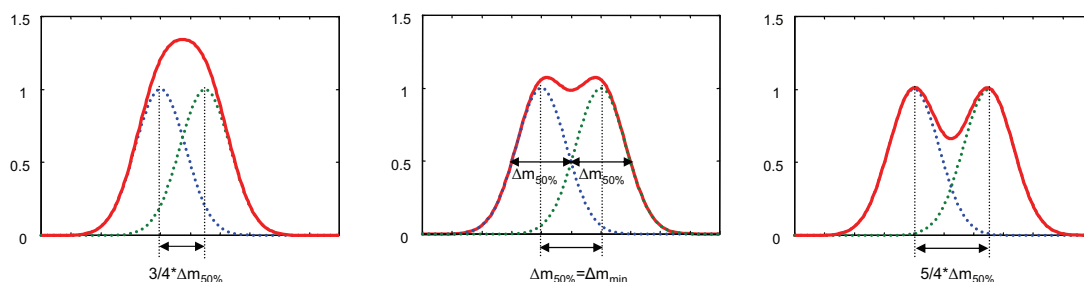


Abbildung 4.5: Überlagerung von zwei gleich intensiven gaußförmigen Peaks bei drei verschiedenen Abständen zueinander. Im linken Bild beträgt der Abstand $3/4$ der Peakbreite $\Delta m_{50\%}$. Man erkennt, dass die beiden einzelnen Peaks (gestrichelt) zu einem Peak verschmelzen (durchgehende Linie). Bei einem Abstand von genau $\Delta m_{50\%}$ (Mitte) sind die beiden Signalspitzen schon unterscheidbar. Vergrößert man den Abstand auf $5/4 \cdot \Delta m_{50\%}$ (rechtes Bild) treten die einzelnen Peaks deutlich hervor.

Ausschlaggebend für die Festlegung eines geeigneten Grenzwertes Δm_{\min} sind die Massendifferenzen häufig auftretender Isotopenkonfigurationen in organischen Verbindungen. Da das Element Kohlenstoff in organischen Verbindungen immer signifikante Isotopenpeaks verursacht, wird in Tabelle 4.3 einer Konfiguration eines Heteroatoms immer eine isobare ^{13}C -Konfiguration gegenübergestellt und deren Massendifferenz angegeben.

Tabelle 4.3: Massendifferenzen Δm signifikanter Isotopenkonfigurationen organischer Verbindungen

^{13}C -Konfiguration ^a	Heteroatom-Konfiguration ^a	Δm [mDa]
$\text{R}^{13}\text{C}_2^{16}\text{O}$	$\text{R}^{12}\text{C}_2^{18}\text{O}$	2,47
$\text{R}^{13}\text{C}^1\text{H}$	$\text{R}^{12}\text{C}^2\text{H}$	2,92
$\text{R}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$	$\text{R}^{12}\text{C}^{15}\text{N}$	6,32
$\text{R}^{13}\text{C}_2^{79}\text{Br}$	$\text{R}^{12}\text{C}_2^{81}\text{Br}$	8,76
$\text{R}^{13}\text{C}_2^{35}\text{Cl}$	$\text{R}^{12}\text{C}_2^{37}\text{Cl}$	9,66
$\text{R}^{13}\text{C}_2^{32}\text{S}$	$\text{R}^{12}\text{C}_2^{34}\text{S}$	10,91

a) R ist ein beliebiger Rest.

Die größte Massendifferenz von $\Delta m = 10,91$ mDa tritt zwischen der $^{13}\text{C}_2$ -Konfiguration und der ^{34}S -Konfiguration einer schwefelhaltigen Verbindung auf. Damit gewährleistet ist, dass ein hochauflösendes Simulationsverfahren benutzt wird, wenn die instrumentelle Auflösung groß genug ist, um alle isobaren Konfigurationen aus Tabelle 4.3 getrennt dazustellen und Ungleichung (4.1) erfüllt ist, muss Δm_{\min} auf die größte Massendifferenz gesetzt werden.

$$\Delta m_{\min} \geq \frac{M}{R_{FWHM}} \quad (4.1)$$

Je größer Δm_{\min} gewählt wird, desto geringer muss die instrumentelle Auflösung für die Verwendung eines hochauflösenden Simulationsverfahrens sein.

Sofern bekannt ist, dass kein Schwefel im untersuchten Analyten vorkommt, kann der Wert von Δm_{\min} entsprechend reduziert werden. Dies ist aber im Allgemeinen nicht zwingend notwendig, da diese geringfügige Modifikation von Δm_{\min} das ausgewählte Simulationsverfahren nur weniger Peaks eines Spektrums beeinflusst und die dadurch gewonnene Zeitersparnis relativ gering ausfällt.

4.2.3. Bestimmung der Auflösung

Für eine den experimentellen Gegebenheiten entsprechende Simulation muss die Auflösung im simulierten Massenbereich bekannt sein. Die instrumentelle Auflösung eines Massenspektrometers zeigt einen typischen masseabhängigen Verlauf, der vom verwendeten Analysatortyp abhängt. Bei Sektorfeld-MS ist die instrumentelle Auflösung eine Funktion des Verhältnisses der Weiten von Ein- und Austrittsspalt, und deshalb unabhängig von der Masse m ($R = \text{konstant}$) [77]. In TOF-MS steigt die Auflösung linear mit zunehmender Flugzeit und damit mit der Masse der Ionen an ($R \sim t \sim m$) [81] und in FTICR-Geräten nimmt die Auflösung mit zunehmender Masse ab ($R \sim 1/m$) [93]. Dies eröffnet die Möglichkeit, auf eine explizite Angabe der experimentellen Auflösung für jeden Peak eines Spektrums zu verzichten, und stattdessen den von der Masse abhängigen Wert der Auflösung durch eine geeignete Gleichung und die Angabe einiger bekannter Punkte zu approximieren. Für die Interpolation des Auflösungsverlaufes von FTICR-MS wird Gleichung (4.2) verwendet.

$$R_{FWHM}(m) = a + \frac{b}{m} \quad (4.2)$$

Zur Berechnung der Koeffizienten a und b ist die Angabe von zwei bekannten Wertepaaren (m, R) notwendig. Die Verläufe von Sektorfeld- und TOF-MS können durch ein Polynom zweiten Grades dargestellt werden, für dessen eindeutige Determinierung drei Referenzpunkte (m, R) benötigt werden.

$$R_{FWHM}(m) = a + bm + cm^2 \quad (4.3)$$

Bei der Bestimmung der Referenzpunkte ist darauf zu achten, dass nur monoisotopische, überlagerungsfreie Peaks verwendet werden, denn nur diese geben die instrumentelle Auflösung korrekt wieder. Darüber hinaus ist es nicht notwendig, die Referenzpunkte für jedes Spektrum neu zu bestimmen, wenn sich an den die Auflösung beeinflussenden Geräteparametern nichts geändert hat.

4.3. Molekülionensuche

Die Suche nach Molekülionen erfolgt durch den Nachweis von mindestens zwei auftretenden Molekülionspezies aus den Tabellen Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 des Abschnittes 3.4.1.1 für einen Peak eines Massenspektrums⁴⁵. Die Menge der Spezies, nach denen gesucht werden soll, kann eingeschränkt werden (vgl. Anhang C). Die Einschränkung des Suchbereiches ist bei komplexen Spektren angebracht, bei denen mehrfache Interpretationen möglich sind, sowie Peaks als Molekülion erkannt werden, die kein solches repräsentieren. Es sollte nur nach Adduktionen gesucht werden, die aufgrund des verwendeten Lösungsmittels und der Herkunft der Probe erwartet werden können.

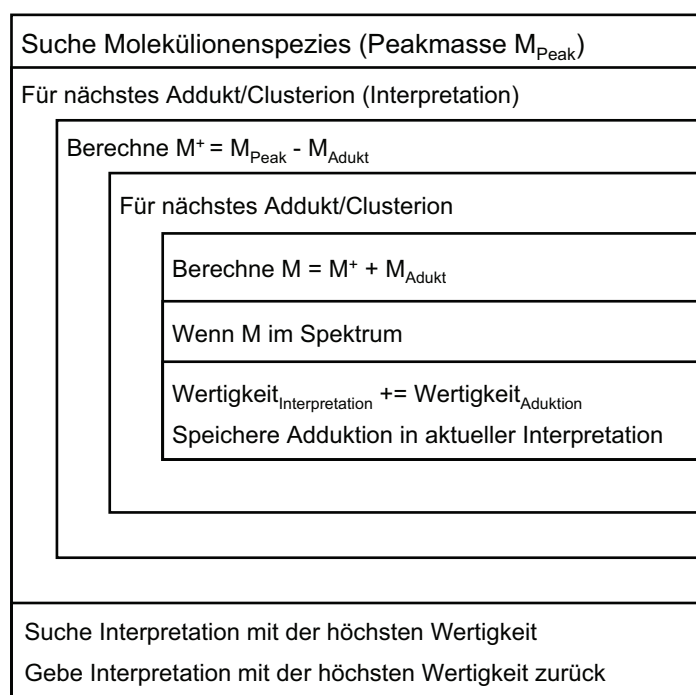


Abbildung 4.6: PAP der Molekülionensuche

In Abbildung 4.6 ist der PAP der Molekülionensuche für einen Peak dargestellt. In der äußeren Schleife wird für diesen Peak eine der möglichen Molekülionspezies angenommen und die Masse M^+ des Peaks durch Subtraktion der Adduktmasse von der Peakmasse bestimmt. Für diese so genannte Interpretation werden anschließend in der inneren Schleife die Massen aller weiteren möglichen Molekülionspezies

⁴⁵ Dabei muss der Peak eine der zwei geforderten Spezies sein.

berechnet. Im Spektrum werden darauf folgend Peaks gesucht, die den berechneten Massen entsprechen. Ist dies der Fall, wird die Wertigkeit der Interpretation um die Wertigkeit des aktuellen Adduktions erhöht und das Adduktion für die Interpretation gespeichert.

Wenn alle ausgewählten Interpretationen abgearbeitet sind, wird diejenige Interpretation gesucht, deren Wertigkeit am größten ist und als Ergebnis zurückgegeben.

Für die Auswertung eines vollständigen Spektrums wird die Suche für jeden Peak des Spektrums wiederholt.

4.4. Fragmentauswertung

4.4.1. Konsistenzüberprüfung zwischen zwei Peaks

Das wesentliche Element bei der Fragmentauswertung stellt die Überprüfung der Konsistenz der EK zweier Peaks dar. Der Peak mit der größeren Masse repräsentiert dabei den Mutterpeak. Die Konsistenzüberprüfung beruht darauf, der Massendifferenz zwischen beiden Peaks, welche den Neutralverlust darstellt, EK zuzuordnen, und zu überprüfen, ob gültige Kombinationen aus der Summe einer EK_{NV} des Neutralverlustes und einer EK_F des Tochterpeaks existieren, die eine EK_M des Mutterpeaks ergeben. Sofern eine Kombination existiert, ist die Konsistenz zwischen den Peaks nachgewiesen.

Wenn zusätzlich bekannt ist, dass Mutter- und Tochterion verwandt sind, d.h. wenn das Tochterion eine Teilmenge des Mutterions ist, dann können alle EK des Mutter- und Tochterions sowie des Neutralverlustes als gültige Lösungen ausgeschlossen werden, für die keine der oben beschriebenen Kombinationen existiert. Eine Verwandtschaft kann vorausgesetzt werden, wenn es sich beim Mutterion um das Molekülion und beim Tochterion um ein beliebiges Fragment einer Verbindung handelt. Durch MS^n -Experimente können auch den Fragmentionen Tochterionen eindeutig zugeordnet werden.

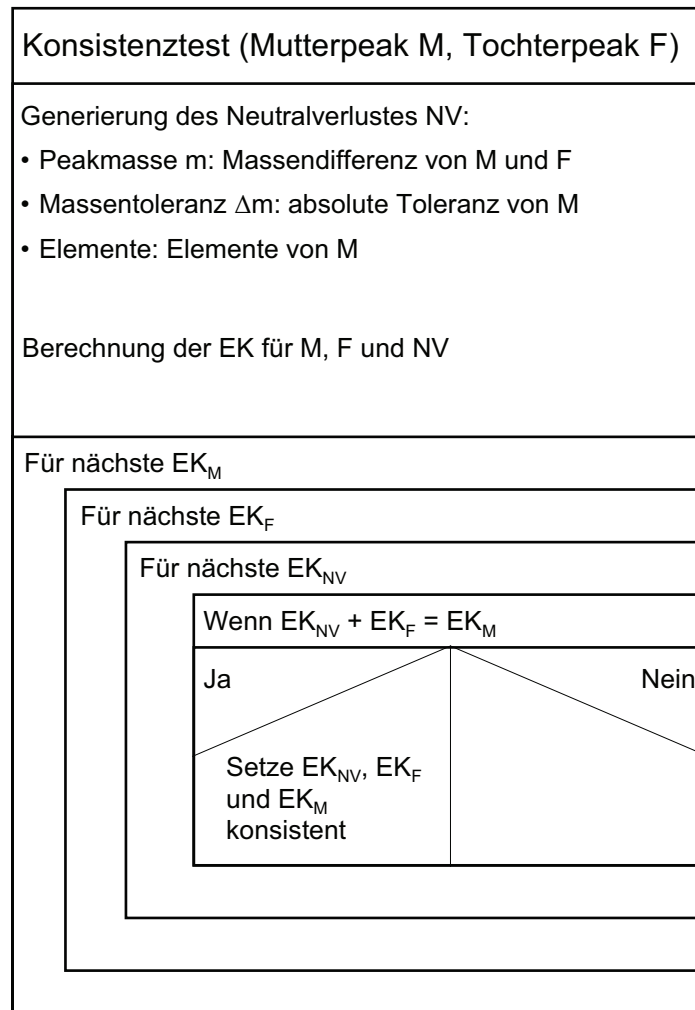


Abbildung 4.7: PAP der Überprüfung der Konsistenz zwischen zwei Peaks

Der Ablauf der Konsistenzüberprüfung ist in Abbildung 4.7 veranschaulicht. Zu Beginn der Berechnung wird aus der Massendifferenz der beiden Peaks die Masse des Neutralverlustes bestimmt. Dem Neutralverlust werden die absolute Massentoleranz und die Elemente des Mutterions zugeordnet. Anschließend werden die EK der zwei Peaks und des Neutralverlustes berechnet. Dabei ist zu beachten, dass für den Neutralverlust keine Isotopenmusteranalyse durchgeführt werden kann, da das Isotopenmuster des Neutralverlustes unbekannt ist. In drei ineinander verschachtelten Schleifen werden alle Kombinationen aus den EK des Mutter- und Tochterions und des Neutralverlustes gebildet und auf Konsistenz überprüft. Sofern eine Reduktion der EK gefordert wird, werden die EK bei einem positiven Test als konsistent markiert und mit der nächsten Kombination fortgefahren. Soll nur die Konsistenz zwischen den Peaks nachgewiesen werden, kann die Berechnung nach einem positiven Ergebnis beendet werden. Kann für keine Kombination von EK eine

Konsistenz nachgewiesen werden, dann sind die überprüften Peaks inkonsistent und somit nachweislich nicht miteinander verwandt.

4.4.2. Berechnung konsistenter EK für Mutter- und Tochterpeaks

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Überprüfung der Konsistenz zwischen einem Mutterpeak und einem Tochterpeak beschrieben. Oftmals kann einem Mutterion, sei es nun das Molekülion oder ein Fragment einer Verbindung, mehr als ein Tochterion zugeordnet werden und es besteht außerdem die Möglichkeit, dass den Tochterionen durch Auswertung von MS^n -Daten wiederum Tochterionen zugeordnet werden können.

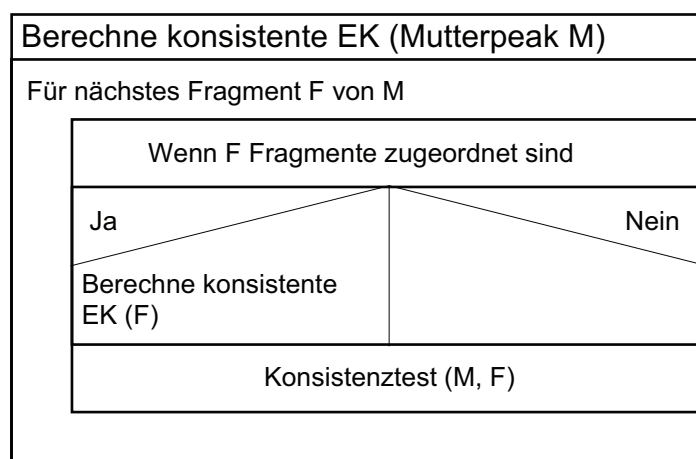


Abbildung 4.8: PAP der Bestimmung konsistenter EK für einen Peak.

Der dadurch definierte Beziehungsbaum zwischen Mutter- und Tochterionen wird sukzessive abgearbeitet, indem schrittweise die Konsistenz aller Tochterionen zum Mutterion geprüft wird. Wenn einem Tochterion selbst andere Tochterionen zugeordnet wurden und das betreffende Tochterion dadurch die Stellung des Mutterions bezüglich seiner Tochterionen einnimmt, wird zuerst die Konsistenz der untergeordneten Tochterionen zu ihrem Mutterion durch rekursiven Aufruf der Funktion aus Abbildung 4.8 überprüft.

4.4.3. Fragmentierungspfade

4.4.3.1. Einordnung

Die Gesamtheit aller Fragmentierungspfade stellt aus graphentheoretischer Sicht einen gewurzelten Baum dar. Kennzeichen dieses Graphen ist das Vorhandensein

eines Knotens, der den Ursprung des Graphen definiert. Ein Graph G wird durch ein Tupel $G = (V, E)$ beschrieben, in dem $V = \{v_1, v_2, \dots, v_n\}$ die n Knoten und $E = \{e_1, e_2, \dots, e_m\}$ die m Kanten des Graphen G abbildet [228]. Jeder Knoten repräsentiert ein Fragmention bzw. das Molekölion (Wurzel des Baumes) und die Kanten bilden die Fragmentierungspfade ab. Jeder Fragmentierungspfad stellt seinerseits den Neutralverlust zwischen den Knoten, die er verbindet, dar.

Beim Fragmentierungsbaum handelt es sich um gerichteten Graphen, weil die Masse der Tochterionen kleiner ist als die Masse der Mutterionen und damit nur eine Richtung einer Kante eine sinnvolle Interpretation besitzt. Da der Ursprung des Baumes die Wurzel ist, spricht man auch von einem „Out Tree“. Die visuelle Darstellung solcher Graphen kann mithilfe von Dendrogrammen erfolgen. Für die interne Darstellung eines Graphen im Computer gibt es verschiedene Varianten, die in Abbildung 4.9 aufgezeigt sind⁴⁶.

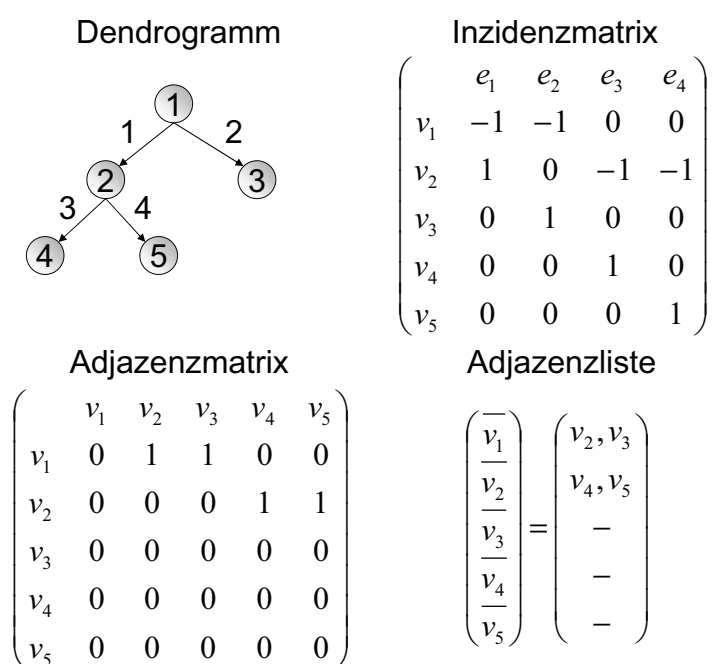


Abbildung 4.9: Mögliche Darstellungsformen eines gerichteten Graphen. Die negativen Einträge in der Inzidenzmatrix kennzeichnen die Ausgangsknoten und die positiven Einträge den Zielknoten einer Kante e des gerichteten Graphen. In der Adjazenzmatrix und Adjazenzliste sind die Richtungsinformationen implizit enthalten.

⁴⁶ Hypergraphen sind von diesen Darstellungsmöglichkeiten ausgenommen.

Gerichtete Graphen mit n Knoten können in einer $n \times n$ -Adjazenzmatrix abgebildet werden. In die i -te Zeile und j -te Spalte der Matrix wird eine Eins eingetragen, wenn der i -te Knoten Vorgänger des j -ten Knotens ist⁴⁷. Besteht keine Nachbarschaft zwischen den Knoten, wird eine Null eingetragen. Der Nachteil dieser Form der Speicherung ist, dass der Speicherbedarf quadratisch ($n \times n = n^2$) mit der Anzahl n der Knoten ansteigt. Verzichtet man für einen Knoten auf die Speicherung aller Kanten zu nichtbenachbarten Knoten (die Nullen in der Matrix), dann kann die Adjazenzmatrix in die Adjazenzzliste überführt werden. In dieser Liste werden alle Knoten des Graphen, und für jeden Knoten in einer weiteren Liste seine nachfolgenden Knoten, gespeichert.

Die Darstellungsformen sind äquivalent, da sie dieselben Informationen enthalten. Eine Adjazenzzliste ist, verglichen mit der Adjazenzmatrix, aufwändiger zu implementieren, allerdings steigt der Speicherbedarf nur linear mit der Anzahl der Knoten. Deshalb wurde diese Form der internen Darstellung eines Graphen für die durchgeführte Implementierung ausgewählt.

4.4.3.2. Berechnung möglicher Fragmentierungspfade

Die Berechnung der möglichen Fragmentierungspfade für eine Menge verwandter Ionen, lässt sich in drei Schritte gliedern:

- Das Mutterion bzw. die Wurzel eines Fragmentierungspfades wird im Spektrum ausgewählt und alle dem Mutterion zugeordneten Fragmente sowie den Fragmenten zugeordnete Subfragmente werden als Knoten in die Adjazenzmatrix des Fragmentierungsbaumes eingetragen. Damit repräsentiert jeder Knoten der Liste einen Peak des Massenspektrums.
- Im nächsten Schritt werden für jeden Knoten v_i die gerichteten Kanten zu den restlichen Knoten des Graphen erzeugt. Für eine gerichtete Kante e wird vorausgesetzt, dass die Masse des Knotens v_i größer ist als die Masse des Zielknotens v_j . Jede erzeugte Kante repräsentiert den Neutralverlust zwischen den Knoten (=Peaks), die sie verbindet.
- Anschließend wird die Konsistenz für jede Kante (=Neutralverlust) und deren Knoten (Ausgangs- und Zielknoten = Mutter- und Tochterion) überprüft.

⁴⁷ Statt der Eins kann in die Matrix auch ein Gewicht eingetragen werden, dass der Kante eine Wertigkeit zuordnet. Dadurch ist es möglich, die Beziehungen zwischen den Knoten näher zu charakterisieren.

Inkonsistente Kanten kommen als Fragmentierungspfad nicht in Frage und werden gelöscht.

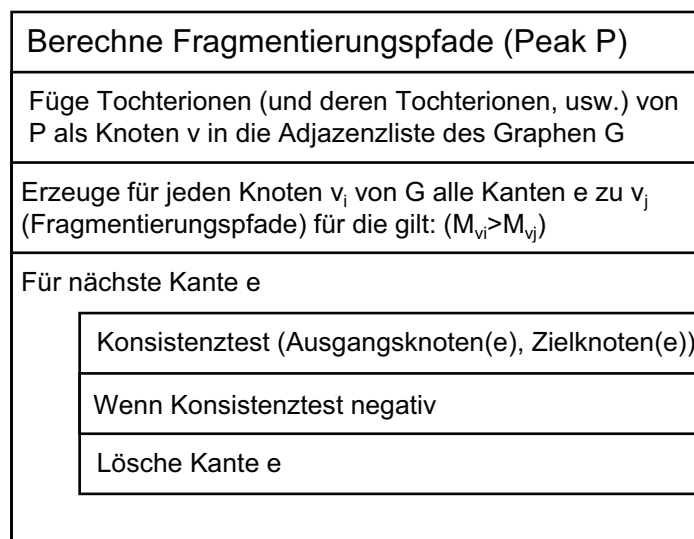


Abbildung 4.10: PAP der Bestimmung aller möglichen Fragmentierungspfade

4.5. Parameter und Benutzeroberflächen

Die Mehrheit der nachfolgend erläuterten Parameter können für jeden Peak separat angezeigt und festgelegt werden. Der zu bearbeitende Peak wird in der Liste am linken Rand des Dialogs aus Abbildung 4.11 ausgewählt. Sollen die Parameter mehrerer Peaks gleichzeitig geändert werden, können mehrere Peaks selektiert werden. Wenn die Parameter eines Peaks als Vorlage für andere Peaks dienen sollen, wird dieser zuerst selektiert und anschließend die Peaks auf die der Parametersatz übertragen werden soll. Ferner besteht die Möglichkeit einen Standardparametersatz (*Default*) zu erzeugen und diesen als Vorlage zu nutzen.

4.5.1. Parameter und Eingabemasken bei der Summenformelbestimmung

Die Angabe der kombinierten Elemente ist ein grundlegender Parameter bei der Summenformelbestimmung. Die dafür entworfene Eingabemaske ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei der Auswahl der Elemente wird zwischen Isotopen unterschieden. Für jeden Peak kann eine separate Zuweisung vorgenommen werden.

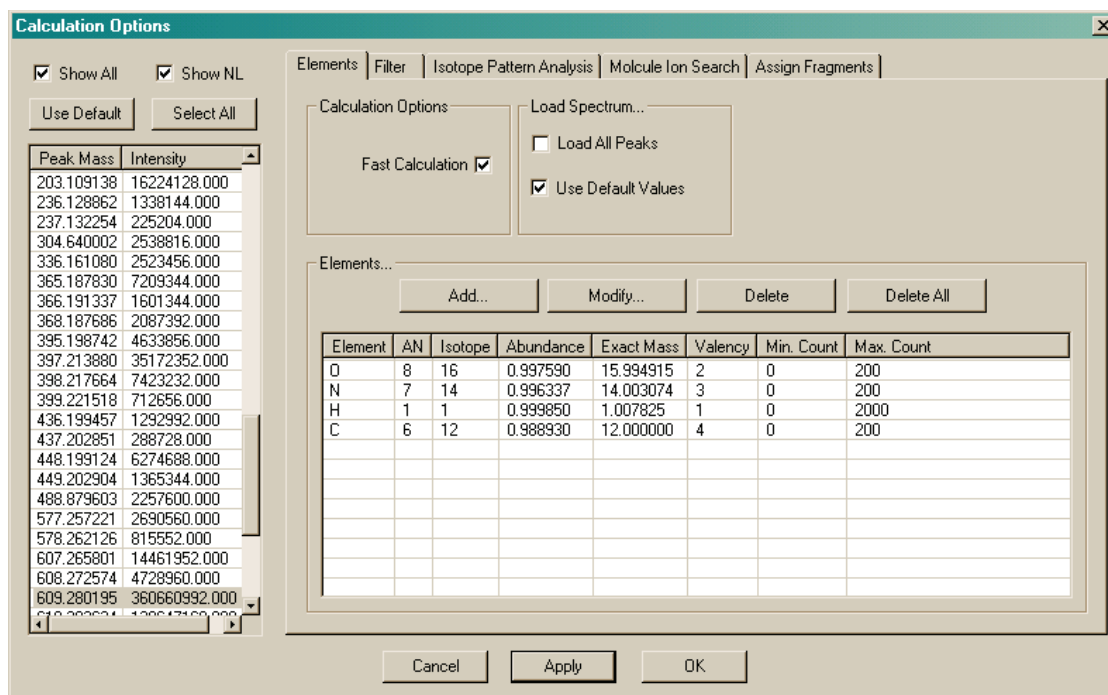


Abbildung 4.11: Bildschirmfoto: Eingabemaske Elemente

Die Parameter der drei Filterfunktionen, die schon bei der Erzeugung der EK angewendet werden, sind auf der in Abbildung 4.12 gezeigten Maske zusammengefasst.

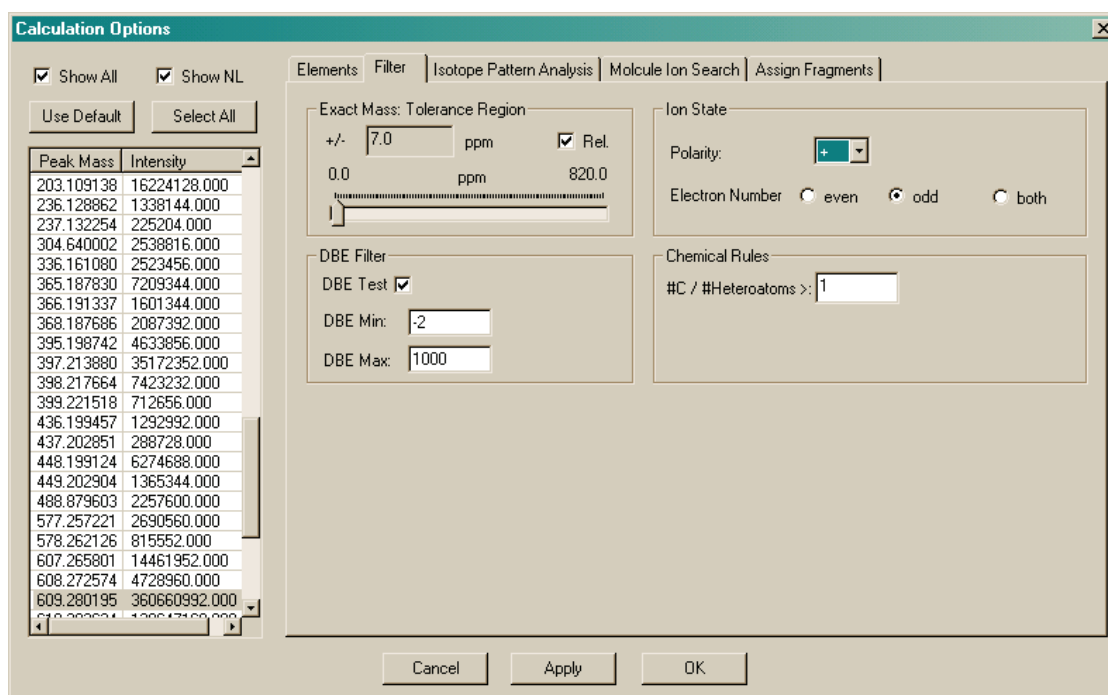


Abbildung 4.12: Bildschirmfoto: Eingabemaske Filter

„**Tolerance Region**“: Die Angabe des Massenfensters $\pm \Delta m$, in dem sich gültige EK befinden müssen, kann absolut in mDa oder relativ in ppm ($\pm \Delta m/M \cdot 10^6$) erfolgen. Der maximal einstellbare Bereich liegt bei ± 500 mDa.

„**DBE Filter**“: Hier wird der Bereich für ein gültiges RDB-Äquivalent angegeben und der Filter aktiviert.

„**Ion State**“: Aus dem RDB-Äquivalent kann auf die Gerad- und Ungeradzahligkeit der Valenzelektronenanzahl einer EK geschlossen werden. Für ausgewählte Ionen kann hier eine Einschränkung vorgenommen werden⁴⁸.

„**#C / #Heteroatoms**“: Das Verhältnis der Anzahl der Kohlenstoffatome zur Anzahl der Heteroatome in einer gültigen EK muss größer sein, als der hier angegebene Wert. Durch Eingabe von -1 wird der Filter deaktiviert.

Alle Parameter auf dieser Eingabemaske sind Peak spezifisch, d.h. jedem Peak können unterschiedliche Werte zugewiesen werden.

4.5.2. Parameter und Eingabemaske der Isotopenmusteranalyse

Mit Ausnahme der Parameter „*Mass Tolerance Factor*“, „*Noise Level*“, „*Rel. Noise Tol.*“, „*Min. Mass Distance for High Res.*“ und den Punkten für die Interpolation der Auflösung sind alle Parameter dieser Maske einem einzelnen Peak zugeordnet.

Peak Masse	Intensität
303.050264	94799872.000
304.053757	13611008.000
304.053757	13611008.000
305.054426	1036704.000
305.057460	984194.000
317.066210	372696.000
355.070882	362376.000
429.089792	329040.000
449.108608	1317632.000
450.112025	302352.000
465.103499	22217728.000
466.107023	4445184.000
467.109362	608088.000
489.061821	395272.000
518.015196	746432.000
585.215323	7233792.000
585.215323	7233792.000
586.219219	2387584.000
587.222432	385832.000
595.166718	751696.000
597.002673	378640.000
611.161265	43484160.000

Abbildung 4.13: Bildschirmfoto: Eingabemaske Isotopenmusteranalyse

⁴⁸ Vor allem für Molekülionen sinnvoll. Vgl. Abschnitt 3.3.2.

„Isotope Pattern Calculator Options“:

- **„Pruning Threshold“:** Relativer Minimalwert der Intensität einer Isotopenkonfiguration bei der polynomialen Methode und der diskreten Faltung. Isotopenkonfigurationen mit einer geringeren Intensität werden nach jeder Iteration von der Berechnung ausgeschlossen.
- **„Max. Combinations“:** Dieser Parameter begrenzt die Anzahl der Konfigurationen für die Isotopenmustersimulation mit der polynomialen Methode. Übersteigt die Zahl der Kombinationen den Grenzwert werden die überzähligen Konfigurationen von der nächsten Iteration ausgeschlossen.
- **„Points per Peaktop (w)“:** Anzahl der Datenpunkte mit der der Massenbereich $\Delta m_{50\%}$ bei den hochauflösenden Simulationsmethoden diskretisiert wird.

„Filter Options“:

- **„Show Interpreted Peaks“:** EK deren Isotopenmuster mit weniger spektralen Peaks als der hier angegebenen Anzahl korrelieren werden herausgefiltert.
- **„Min. Intensity Corr.“:** Minimale Intensitätskorrelation. EK mit einer geringeren Intensitätskorrelation werden ausgeschlossen.
- **„Mass Tolerance Factor“:** Bei der Suche nach spektralen Peaks für ein simuliertes Muster wird die angegebene Massentoleranz mit diesem Wert multipliziert. Dadurch ist es möglich das Suchfenster aus Abschnitt 3.3.4 zu vergrößern bzw. zu verkleinern.

„Calculation Method“:

- **„Auto Select“:** Wenn diese Option ausgewählt ist, wird die Berechnungsmethode nach dem in Kapitel 4.2.2 geschilderten Verfahren bestimmt.
- **„Min. Mass Distance for High Res. [Da]“:** Die ist der Parameter Δm_{\min} aus Abschnitt 4.2.2. Er beeinflusst die Auswahl des verwendeten Simulationsverfahrens in Abhängigkeit von der Auflösung.
- **„Polynomial Method, FFT Method Discrete Convolution“:** Verwendete Methode für die Isotopenmustersimulation. Sofern die Methode nicht automatisch bestimmt wird, kann hier das bevorzugte Verfahren explizit angegeben werden.

„Spectral Properties“:

- **„Auto Resolution“:** Durch Setzen dieser Option wird die spektrale Auflösung, unter Verwendung von zwei oder drei bekannten Punkten mit der angegebenen Interpolationsfunktion für jeden Peak in Abhängigkeit von der Peakmasse, approximiert.
- **„Resolution“:** Zeigt die spektrale Auflösung an wenn „Auto Resolution“ ausgewählt ist wird, oder dient zur Angabe der Auflösung falls die Auflösung nicht interpoliert werden soll.
- **„Set Points“:** Öffnet einen Dialog in dem zwei bzw. drei Punkte angegeben werden können, die für die Interpolation der Auflösung verwendet werden. Außerdem wird hier das Interpolationspolynom festgelegt.
- **„Noise Level“:** Spektrales Rauschlevel I_{Noise}^* aus Abschnitt 3.3.4. Es ist darauf zu achten, dass die Intensität des Rauschens in dergleichen Normierung wie die Intensität der Peaks angegeben wird.
- **„Relative Noise Tolerance“:** Toleranz I_{tol} beim Ausschluss von simulierten Isotopenmustern aufgrund fehlender oder überschüssiger Peaks (vgl. Abschnitt 3.3.4). Wird I_{tol} Null gesetzt, dann werden die ersten beiden Ausschlusskriterien deaktiviert und Filterung erfolgt nur noch über die berechnete Intensitätskorrelation.

4.5.3. Parameter und Eingabemaske bei der Suche nach Molekülonen

In diesem Dialog können die Addukt- bzw. Clusterionenspezies festgelegt werden, die bei der Suche nach Molekülonen im Spektrum berücksichtigt werden. Der Verlauf der Suche wurde in Abschnitt 4.3 beschrieben. Die vorgenommene Einstellung gilt für das gesamte Spektrum. Wenn die Option „Add Missing Elements“ ausgewählt wird, dann werden den erkannten Molekülionpeaks automatisch fehlende Elemente (Na, K, Cs, usw.) hinzugefügt.

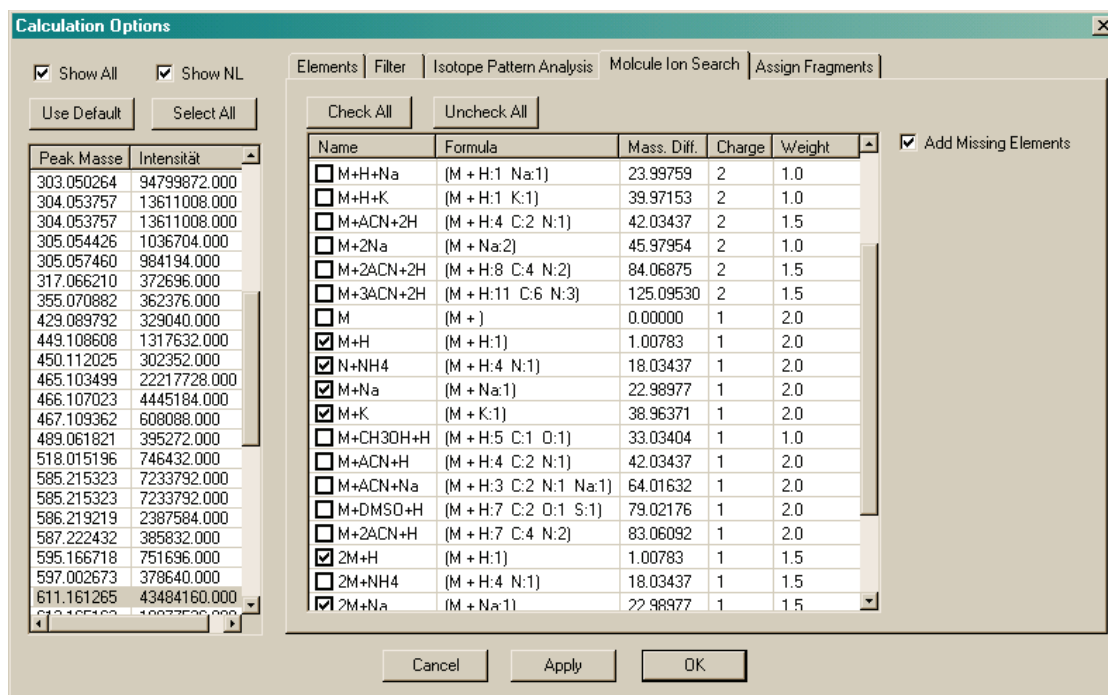


Abbildung 4.14: Bildschirmfoto: Molekülionensuche

4.5.4. Parameter und Eingabemaske für die Zuweisung von Fragmenten

In dieser Maske können dem in der linken Liste ausgewählten Peak Fragmentpeaks zugeordnet werden. In der Liste „Possible Fragment Peaks“ erscheinen diejenigen Peaks des Spektrums, welche als mögliche Fragmentpeaks in Frage kommen. Als Fragment zugeordnete Peaks erscheinen in der rechten Liste „Assigned Fragment Peaks“.

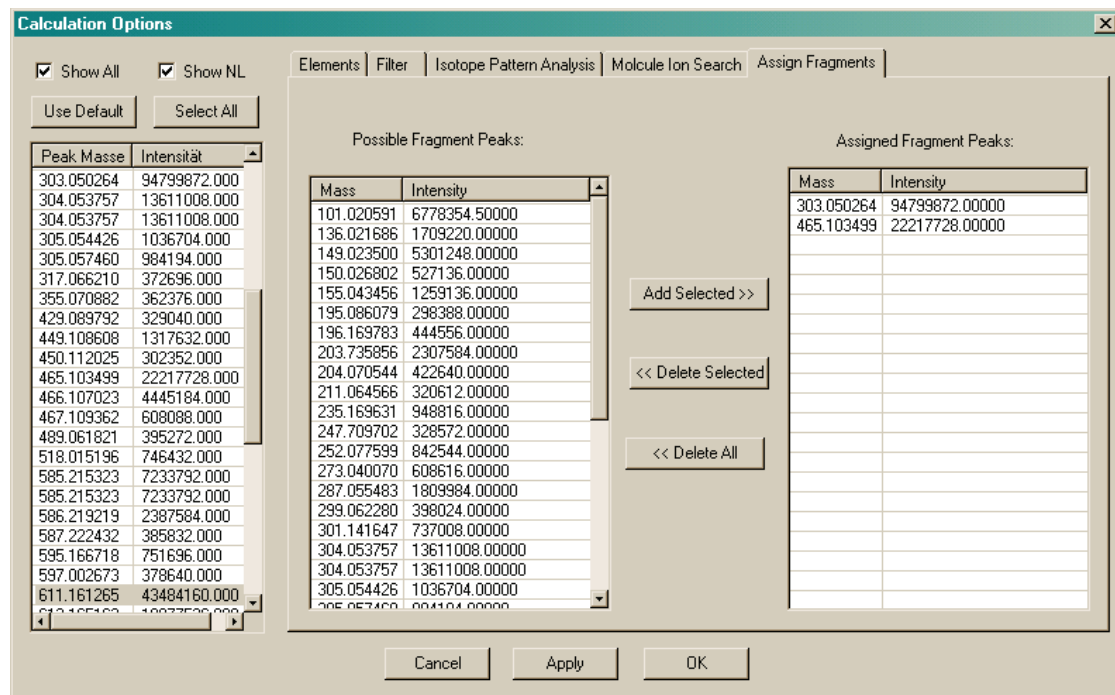


Abbildung 4.15: Bildschirmfoto: Zuweisung von Fragmenten

5. Applikationsbeispiele

5.1. Einfluss des Isotopenmusterfilters

Anhand dieses Beispiels soll der reduzierende Effekt des Isotopenmusterfilters auf die Anzahl der EK, die einer exakten Masse zugeordnet werden können, untersucht werden. Dafür wurden 25 Verbindungen mit bekannter Elementarzusammensetzung eingesetzt. Bei den Verbindungen handelt es sich um Syntheseprodukte aus der pharmazeutischen und katalytischen Forschung, deren Massen zwischen 300 und 1000 Da liegen. Die Verbindungen wurden entweder in Methanol/Wasser (50:50), Acetonitril/Wasser (50:50) mit 1% Ameisensäure, oder Isopropanol/Wasser (50:50) gelöst. Die Konzentration lag in einem Bereich von 1-2 mg pro ml Lösungsmittel.

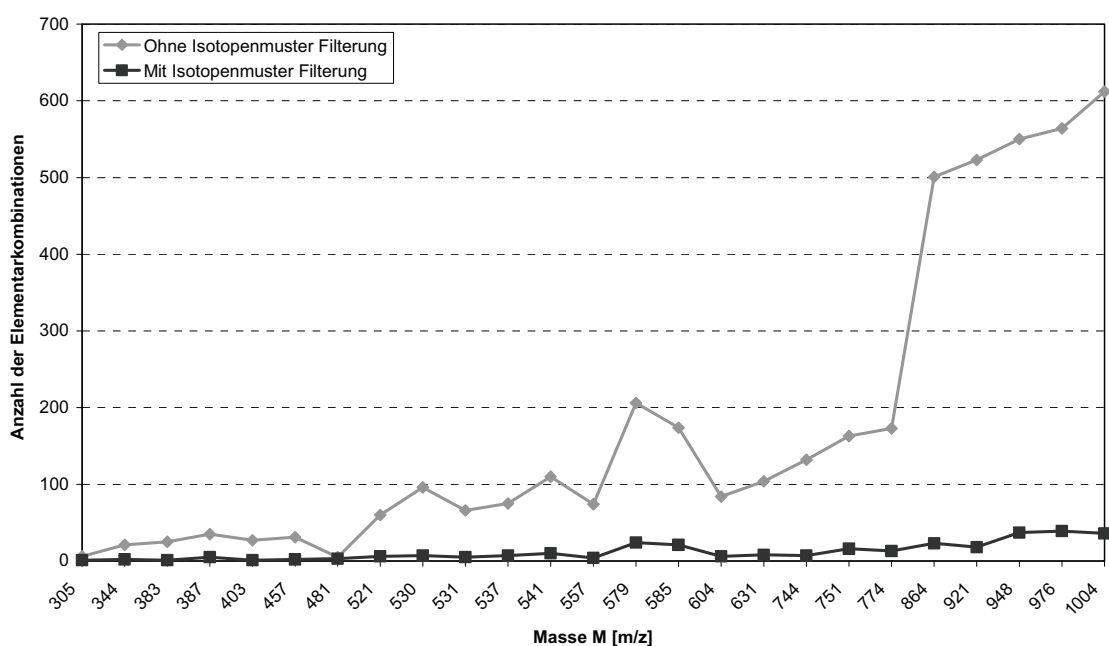


Abbildung 5.1: Einfluss des Isotopenmusterfilters auf die Anzahl der ermittelten EK für Molekülonen von 25 Verbindungen im Bereich von 300 - 1000 Da. Die Spektren wurden mit einem FTICR-MS und Elektrospray Ionisation aufgenommen. Die Toleranz der Massenbestimmung beträgt $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm. Es wurden die 8 Elemente C, H, N, O, Ru₀₋₁, S₀₋₂, Cl₀₋₂, Br₀₋₂ berücksichtigt und ein Ring-Doppelbindungsäquivalent im Bereich von $-0.5 < \text{RDB } 1000$ vorausgesetzt. Für eine gültige EK wurde eine minimale Intensitätskorrelation von $I_{\text{corrin}} = 80\%$ erwartet. In keinem Fall wurde die richtige EK ausgeschlossen.

In Abbildung 5.1 ist die Anzahl der ermittelten EK für die 25 Verbindungen ohne und mit Anwendung des Isotopenmuster-Filters dargestellt. In beiden Fällen wurde der RDB-Filter eingesetzt und mit den 8 Elementen C, H, N, O, S, Cl, Br und Ru kombiniert. Die Anzahl von Ruthenium wurde auf maximal Eins und die Anzahl von Chlor, Brom und Schwefel auf maximal Zwei beschränkt.

Man erkennt, dass der Isotopenmusterfilter zu einer deutlichen Reduktion der gültigen EK beiträgt. Durchschnittlich wurden 90% der EK durch den Isotopenmusterfilter und in keinem Fall die richtige EK ausgeschlossen. Den Hauptteil der ausgeschlossenen EK bilden diejenigen, die einen zu hohen oder zu niedrigen Anteil eines isotopisch signifikanten Elementes (Chlor, Brom, Ruthenium) enthalten. Die Anteile dieser Elemente in den resultierenden EK sind nahezu immer exakt bestimmt worden. Die einzige Ausnahme bilden die Verbindungen, in denen zwei Bromatome enthalten waren, für die sowohl EK mit zwei Bromatomen als auch EK mit zwei Chloratomen und einem Bromatom ermittelt wurden. Die Ursache hierfür ist der ähnliche Einfluss der beiden Varianten auf das resultierende Isotopenmuster [229].

Aus den Berechnungsergebnissen für Verbindung 15 (Tabelle 5.1) wird deutlich, dass die Anzahl der Kohlenstoffatome aus dem Isotopenmuster nur mit einer geringen Genauigkeit bestimmt werden kann, denn in den resultierenden EK sind deutliche Schwankungen der Kohlenstoffanzahl zu beobachten. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass die Auftrittswahrscheinlichkeit des ^{13}C -Isotops nicht groß genug ist, um eine deutlichen Veränderung des Musters zu verursachen, wenn die Zahl der Kohlenstoffatome nur gering verändert wird. Die gleiche Aussage gilt auch für die anderen Elemente (N, O, S, H), deren sekundäre Isotope nur geringe Auftrittswahrscheinlichkeiten aufweisen, weil die instrumentelle Auflösung in diesem Beispiel nicht ausreicht, um isobare Isotopenkonfiguration getrennt darzustellen.

Tabelle 5.1: Berechnungsergebnisse für das (M+Na)⁺-Ion (585 Da) von Verbindung 15 (C₂₇H₂₃N₄S₁Br₁). Die instrumentelle Auflösung beträgt 52000

Nr.	EK								m _{the.} [Da]	Δm [mDa]	Δm/m [ppm]	RDB	I _{cor} [%]	n _{intp}
	H	C	N	O	Na	S	Cl	Br						
1	19	35	2	1	1	0	0	1	585.057297	0.000472	0.8	26.5	91.01	5
2	15	20	14	2	1	0	0	1	585.0578	0.000975	1.7	19.5	95.17	5
3	19	19	10	6	1	0	0	1	585.056464	0.000361	0.6	14.5	93.86	5
4	23	23	4	8	1	0	0	1	585.05915	0.002325	4	13.5	97.29	5
5	23	18	6	10	1	0	0	1	585.055128	0.001697	2.9	9.5	92.46	5
6	27	22	0	12	1	0	0	1	585.057814	0.000989	1.7	8.5	95.98	5
7	19	23	10	1	1	1	0	1	585.05396	0.002865	4.9	18.5	95.19	4
8	23	27	4	3	1	1	0	1	585.056646	0.000179	0.3	17.5	94.82	4
9	27	26	0	7	1	1	0	1	585.05531	0.001515	2.6	12.5	97.37	5
10	23	11	12	8	1	1	0	1	585.055813	0.001012	1.7	5.5	85.87	4
11	27	15	6	10	1	1	0	1	585.058499	0.001674	2.9	4.5	88.98	4
12	31	14	2	14	1	1	0	1	585.057163	0.000338	0.6	0.5	87.52	4
13	23	20	10	1	1	2	0	1	585.057331	0.000506	0.9	13.5	91.05	4
14	27	19	6	5	1	2	0	1	585.055995	0.00083	1.4	8.5	90.37	4
15	31	23	0	7	1	2	0	1	585.058681	0.001856	3.2	7.5	91.85	4
16	31	18	2	9	1	2	0	1	585.054659	0.002166	3.7	3.5	89.46	4

5.2. Reserpin

Am Beispiel des Indolalkaloids Reserpin (C₃₃H₄₀N₂O₉) soll gezeigt werden, dass die Einbeziehung von Fragmentationen bei der Charakterisierung einer Verbindung die Anzahl der dem Molekülion und den Fragmenten zugeordneten EK reduziert. Ferner werden mögliche Fragmentierungspfade aus der Konsistenz zwischen den Fragmentationen abgeleitet. Im oberen Massenspektrum aus Abbildung 5.2 ist das positive ESI-Spektrum der untersuchten Substanz dargestellt. Die drei auftretenden Molekülionaddukte bei 609 Da (M+H)⁺, 631 Da (M+Na)⁺ und 741 Da (M+Cs)⁺ ermöglichen die Bestimmung der Molekülmasse mit 608 Da. Durch ein erhöhtes Fragmentierungspotenzial im Quellenbereich treten gleichzeitig acht signifikante Fragmentationen auf, die durch ein MS²-Experiment dem (M+H)⁺-Ion zugeordnet werden können (Abbildung 5.2 unten).

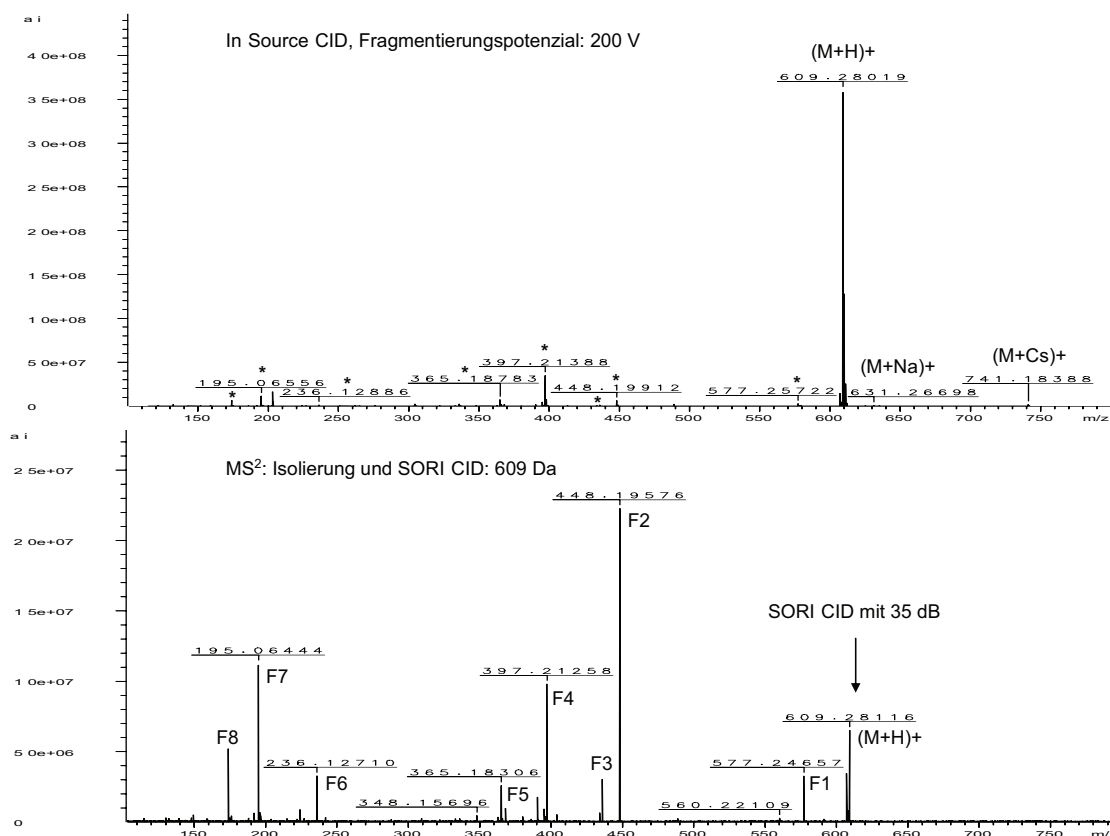


Abbildung 5.2: FTICR-ESI-Spektren von Reserpin im positiven Ionisierungsmodus. Das obere Spektrum wurde mit einem erhöhten Fragmentierungspotenzial im Quellenbereich aufgenommen (*In-Source*-CID). Die dabei entstandenen acht Fragmente (*) konnten durch ein MS²-Experiment, bei dem das Molekülion $(M+H)^+$ von Reserpin (609 Da) in der Messzelle des MS isoliert und anschließend gezielt durch ein in den Analysatorraum eingebrachte Kollisionsgas (Argon) und darauf folgender Anregung mittels eines SORI-Impulses fragmentiert wurde, bestätigt werden.

Unter Berücksichtigung der Elemente C, H, N, O, Cl und Br einem positiven RDB-Äquivalent, einer ungeraden Valenzelektronenzahl, einem minimalen Verhältnis der Kohlenstoff- und Heteroatome von Eins und einer Intensitätskorrelation von mindestens 85% können dem $(M+H)^+$ -Peak des Spektrums in einem Toleranzbereich von ± 7 ppm elf EK zugeordnet werden.

Für alle acht nachgewiesenen Fragmentionen kann vorausgesetzt werden, dass sie durch chemisch plausible Neutralverluste aus dem Molekülion hervorgehen. Führt man den in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Konsistenztest zwischen den EK des Molekülions und der acht Fragmente durch, verbleiben von den zwölf EK nur zwei, die dem Molekülionen zugeordnet werden können ($C_{34}H_{37}N_6O_5$, $C_{33}H_{41}N_2O_9$).

Um Aussagen über die Entstehungswege der Fragmente treffen zu können, wird die zwischen den Fragmentionen bestehende Konsistenz der EK untersucht und führt zu dem in Tabelle 5.2 dargestellten Ergebnis.

Tabelle 5.2: Aus der Überprüfung der Konsistenz zwischen den betrachteten Ionen der Substanz Reserpin resultierende Adjazenzmatrix.

Ion	konsistente Ionen
M	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8
F1	F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8
F2	F3, F5, F6, F7, F8
F3	F5, F6, F7, F8
F4	F5, F6, F7, F8
F5	F6, F8
F6	F8
F7	
F8	

Jede nachgewiesene Konsistenz repräsentiert einen möglichen Fragmentierungspfad. Von den insgesamt 36 möglichen Fragmentierungspfaden, wurden 5 ausgeschlossen, da keine Konsistenz zwischen den Fragmenten F2 und F4, F3 und F4, F5 und F7, F6 und F7 sowie F7 und F8 besteht. Die Inkonsistenzen deuten auf eine oder mehrere Verzweigungen im Fragmentierungspfad hin. Für eine eindeutige Bestimmung des tatsächlichen Fragmentierungsweges sind weitere MS³-Experimente erforderlich, die es ermöglichen, weitere Pfade auszuschließen.

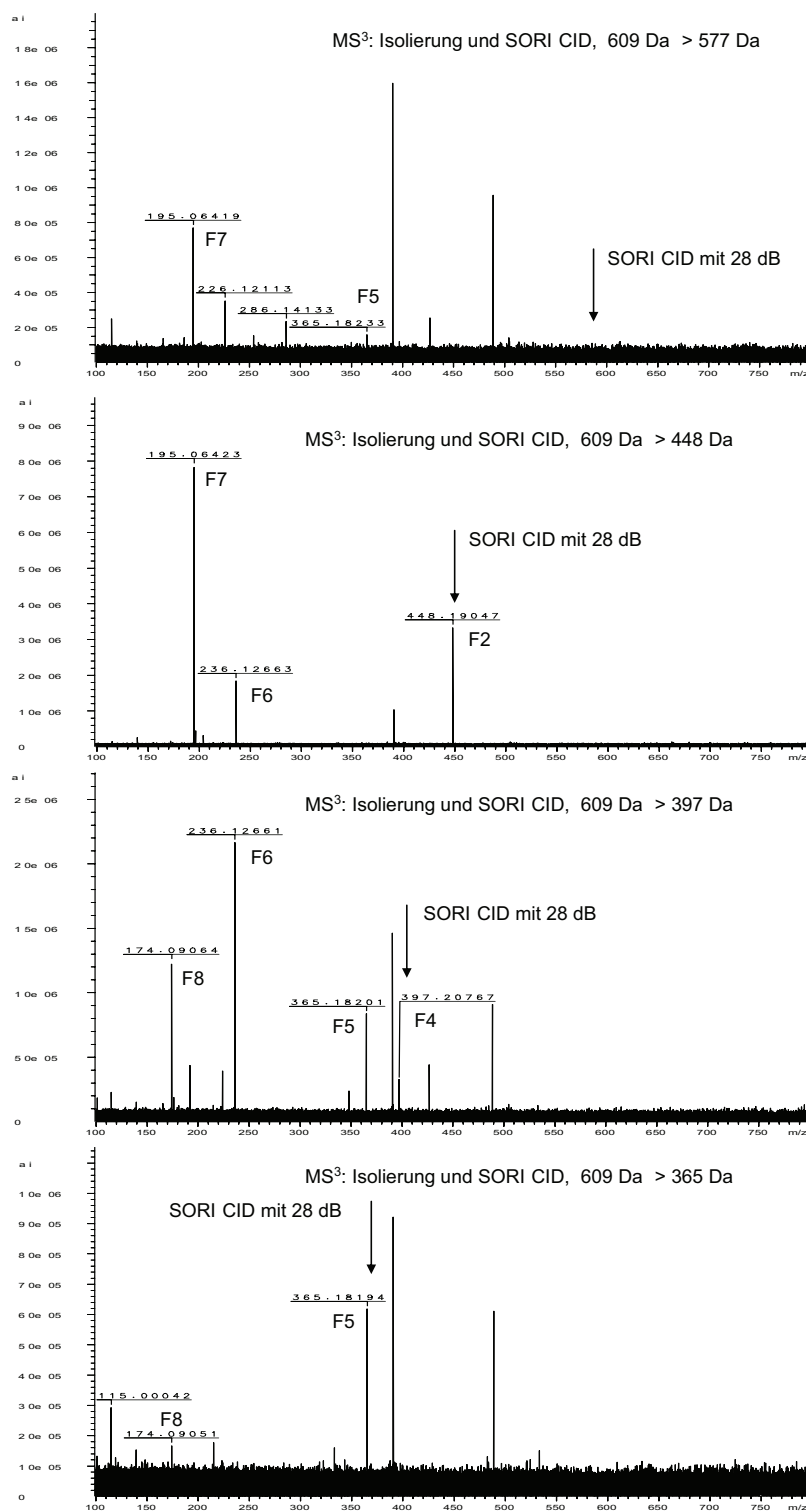


Abbildung 5.3: MS³-Spektren der Fragmente F1, F2, F4 und F5. Die Fragmentierung erfolgte nach der Isolierung des betreffenden Ions durch SORI-CID mit Argon in der Analysatorzelle eines FTICR-MS.

Durch die Isolierung der untersuchten Ionen ist sichergestellt, dass die auftretenden Tochterionen eindeutig dem fragmentierten Mutterion zugeordnet werden können. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Tabelle 5.3.

Tabelle 5.3: Übersicht über die durch MSⁿ-Experimente nachgewiesenen Tochterionen der vier Fragmente F1, F2, F4 und F5

Fragment (Masse)	Tochterionen (Masse)
F1 (577)	F5 (365), F7 (195)
F2 (448)	F6 (236), F7 (195)
F4 (397)	F5 (365), F6 (236), F8 (174)
F5 (365)	F8 (174)

Es zeigt sich, dass keines der nachgewiesenen Tochterionen im Widerspruch mit den Ergebnissen des Konsistenztestes aus Tabelle 5.2 steht. Eine Wiederholung des Konsistenztestes unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Fragmentierungswege führt zwar nicht zu einer eindeutigen Bestimmung der EK des Molekülions, aber dennoch zu Reduzierung der EK, die den einzelnen Fragmenten zugeordnet werden können.

Tabelle 5.4: Anzahl der EK ohne (a) und mit Anwendung des Isotopenmusterfilters (b), sowie mit zusätzlicher Konsistenzüberprüfung zwischen den Fragmenten und dem Molekülion (c) und zwischen verwandten Fragmenten unter Berücksichtigung der MSⁿ-Informationen aus Tabelle 5.3 (d). Verbleibende EK für das Molekülion und die acht betrachteten Fragmente im Fall d.

Ion	Masse [Da]	#EK ^a	#EK ^b	#EK ^c	#EK ^d	verbleibende EK
M	609,28019	49	11	2	2	C ₃₄ H ₃₇ N ₆ O ₅ , C ₃₃ H ₄₁ N ₂ O ₉ ^e
F1	577,25722	77	15	2	2	C ₃₃ H ₃₃ N ₆ O ₄ , C ₃₂ H ₃₇ N ₂ O ₈ ^e
F2	448,19912	27	7	5	3	C ₂₄ H ₂₆ N ₅ O ₄ , C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₅ , C ₂₃ H ₃₀ N ₁ O ₈ ^e
F3	436,19946	25	8	5	3	C ₂₃ H ₂₆ N ₅ O ₄ , C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₅ , C ₂₂ H ₃₀ N ₁ O ₈ ^e
F4	397,21380	13	4	4	1	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄ ^e
F5	365,18783	9	2	2	1	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₃ ^e
F6	236,12886	3	1	1	1	C ₁₃ H ₁₈ N ₁ O ₃ ^e
F7	195,06556	3	1	1	1	C ₁₁ H ₇ N ₄ , C ₁₀ H ₁₁ O ₄ ^e

Ion	Masse [Da]	#EK ^a	#EK ^b	#EK ^c	#EK ^d	verbleibende EK
F8	174.09169	2	1	1	1	C ₁₁ H ₁₂ N ₁ O ₁ ^e

a) Filter: C, H, N, O, Cl, Br, RDB-Filter, $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 7$ ppm, $v_{\text{CHetMin}} = 1$
b) Filter: wie a) und Isotopenmusterfilter: $I_{\text{cormin}} = 85\%$
c) Filter: wie b) und Konsistenzüberprüfung aller Fragmente mit dem Molekülion M
d) Filter: wie c) und Konsistenzüberprüfung zwischen verwandten Fragmenten
e) korrekte EK

Unter Beachtung der rechnerisch möglichen und der experimentell nachgewiesenen Fragmentierungspfade lässt sich der in Abbildung 5.4 gezeigte Fragmentierungsbaum ermitteln.

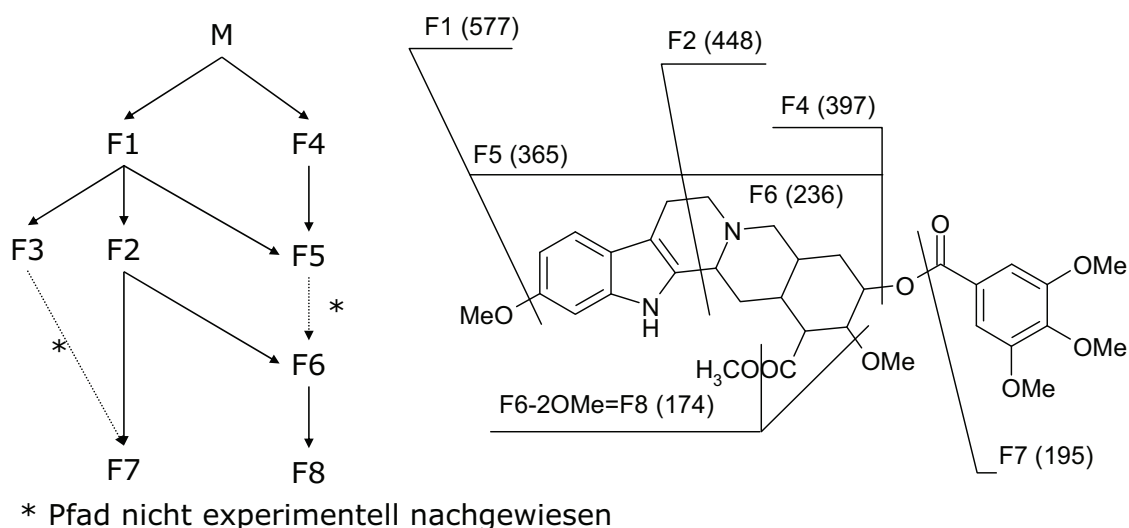


Abbildung 5.4: Aus den nachgewiesenen Tochterionen der Fragmente F1, F2, F4, und F5 resultierende Fragmentierungspfade. Zur Validierung wurden allen Fragmenten Strukturelemente von Reserpin zugeordnet, die mit den dargestellten Fragmentierungspfaden im Einklang stehen.

Eine Überprüfung des generierten Pfades mit der Struktur von Reserpin verdeutlicht, dass jedem Fragment sinnvolle Strukturelemente zugeordnet werden können, die zum einen nicht im Widerspruch zu den generierten Fragmentierungspfaden stehen und zum anderen durch häufig beschriebene Fragmentierungsreaktionen von Ionen in der Gasphase, wie sie in Massenspektrometern auftreten, (α -Spaltung, β -Spaltung, Retro Diels Alder-Reaktion) erklärt werden können.

5.3. Warfarin

Warfarin gehört zur Stoffklasse der Cumarine, von denen einige Vertreter als Blutgerinnungshemmer (Antikogulanten) für die Langzeitbehandlung von Durchblutungsstörungen und zur Thrombosenvorbeugung eingesetzt werden [230]. In Abbildung 5.5 ist das ESI-CID-Spektrum von Warfarin dargestellt, das mit einem Fragmentierungspotenzial von 130 V aufgenommen wurde. Das SORI-CID-Spektrum des Moleküls $((M+H)^+$, 309 Da) weist vier Fragmente auf, die auch im ESI-CID-Spektrum nachzuweisen sind.

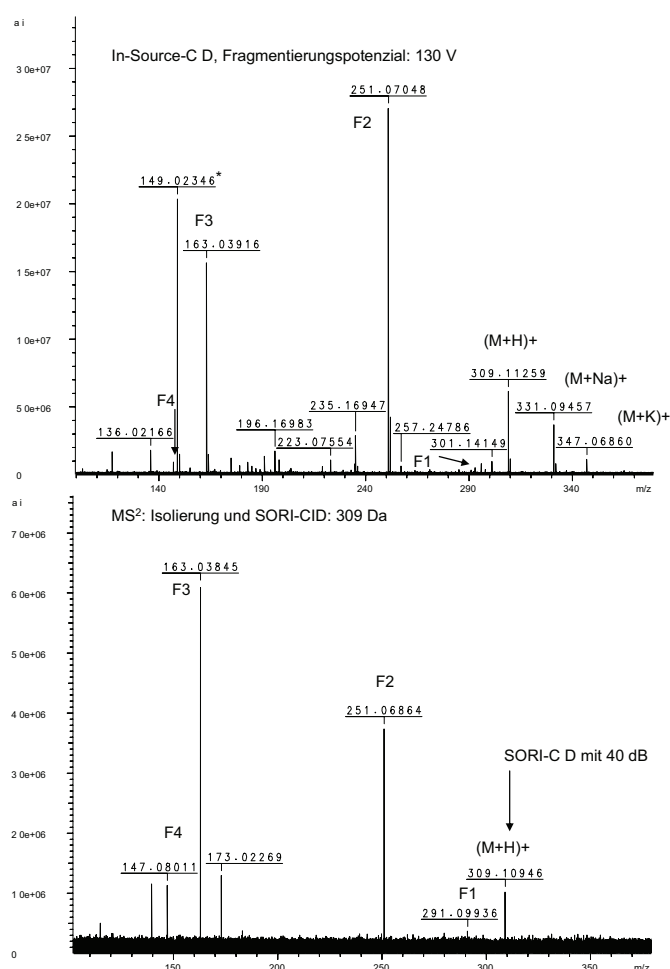


Abbildung 5.5: FTICR-ESI-Massenspektrum von Warfarin im positiven Ionisierungsmodus. Das obere Spektrum zeigt das ESI-CID-Spektrum, das mit einem Fragmentierungspotenzial von 130 V aufgenommen wurde. Das SORI-CID-Spektrum des isolierten Moleküls $(M+H)^+$ bei 309 Da (unten) dient der eindeutigen Zuordnung entstehender Fragmente des ESI-CID-Spektrums zum Molekülion. *Das signifikante Ion bei 149,02346 Da ist ein Fragmentierungsprodukt von Weichmachern auf Phthalatbasis in den verwendeten Probenbehältern.

Durch die Überprüfung der Konsistenz zwischen dem Molekölion und den Fragmenten können die EK aller Ionen eindeutig bestimmt werden (vgl. Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Dem Molekölion und den Fragmenten zugeordnete EK nach durchgeführtem Konsistenztest. Anzahl der EK ohne (a) und mit Anwendung des Isotopenmusterfilters (b) sowie mit zusätzlicher Konsistenzüberprüfung zwischen den Fragmenten und dem Molekölion (c).

Ion	Masse [Da]	konsistente Fragmente	#EK ^a	#EK ^b	#EK ^c	EK
M	309,112589	F1, F2, F3, F4	10	4	1	C ₁₉ H ₁₇ O ₄
F1	291,102150	F2, F3, F4	9	5	1	C ₁₉ H ₁₅ O ₃
F2	251,070478	F3, F4	7	1	1	C ₁₆ H ₁₁ O ₃
F3	163,039156		2	1	1	C ₉ H ₇ O ₃
F4	147,080574		2	2	1	C ₁₀ H ₁₁ O ₁

a) Filter: C, H, N, O, S, Cl, Br, RDB-Filter, $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm, $v_{\text{CHetMin}} = 1$

b) Filter: wie a) und Isotopenmusterfilter: $I_{\text{corMin}} = 85\%$

c) Filter: wie b) und Konsistenzüberprüfung aller Fragmente mit dem Molekölion

Die graphische Darstellung der Adjazenzmatrix aus Tabelle 5.5 (Spalte 1 und 3) in Form eines Dendrogrammes und die Zuordnung von Strukturelementen des Warfarins zu den EK der Fragmente sind in Abbildung 5.6 veranschaulicht.

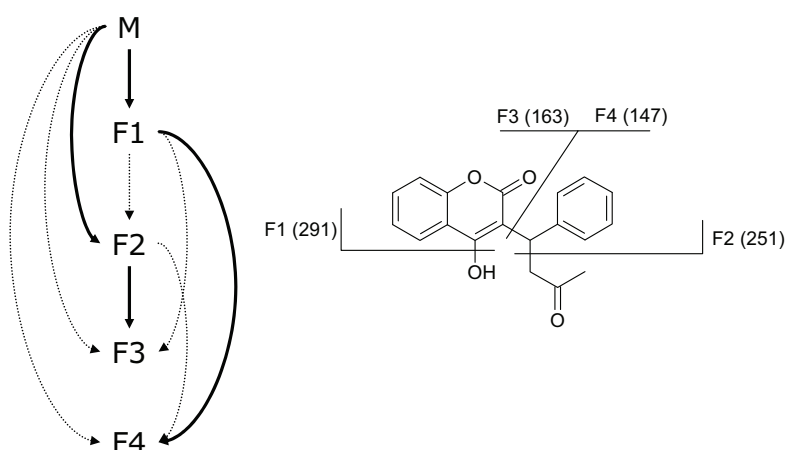


Abbildung 5.6: Mit den EK von Warfarin konsistente Fragmentierungspfade (links). Die fett hervorgehobenen Pfade können in Übereinstimmung mit der dargestellten Struktur (rechts) ermittelt werden.

5.4. Triphenylarsin

In diesem Beispiel wird die Auswertung eines Elektronenstoß-Spektrums von Triphenylarsin demonstriert. Triphenylarsin ist ein Zersetzungsprodukt oder ein Bestandteil chemischer Blaukreuzkampfstoffe („Winterlost“) und kann auch heute noch in Bodenproben ehemaliger Produktions- und Lagerstätten nachgewiesen werden [231, 232]. Das 70 eV Spektrum in Abbildung 5.7 zeigt eine starke Fragmentierung des Moleküls (M^+ , 306 Da). Fünf Ionen können als Fragmente von Triphenylarsin identifiziert werden.

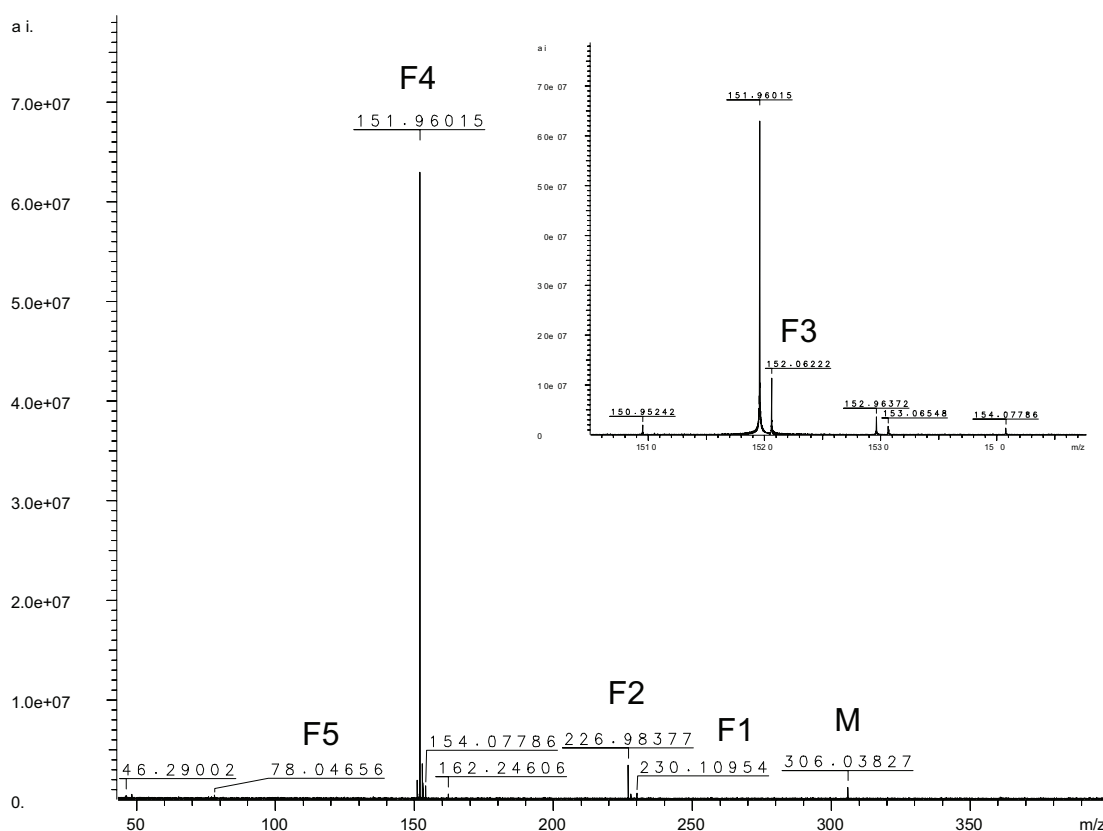


Abbildung 5.7: EI-FTICR-Massenspektrum von Triphenylarsin das mit einem Ionisierungspotenzial von 70 V im positiven Modus aufgenommen wurde.

Für dieses Beispiel wurde mit den acht Elementen C, H, N, O, Cl, Br, As und S kombiniert. Trotz dieser relativ großen Anzahl können die EK aller Ionen eindeutig bestimmt werden.

Tabelle 5.6: Anzahl der dem Molekülion und fünf Fragmenten von Triphenylarsin zugeordneten EK nach drei Auswerteschritten: a) kombinatorische Zuordnung, b) Isotopenmusterfilter, c) Konsistenzüberprüfung der Fragmente mit dem Molekülion. Adjazenzliste konsistenter Fragmentierungspfade und EK jedes Ions.

Ion	Masse [Da]	konsistente Fragmente	#EK ^a	#EK ^b	#EK ^c	EK
M	306,038273	F1, F2, F3, F4, F5	18	9	1	C ₁₈ H ₁₅ As
F1	230,109540	F3, F5	1	1	1	C ₁₈ H ₁₄
F2	226,983774	F3, F4, F5	3	2	1	C ₁₂ H ₈ As
F3	152,062218	F5	1	1	1	C ₁₂ H ₈
F4	151,960151		1	1	1	C ₆ H ₅ As
F5	78,046556		1	1	1	C ₆ H ₆

a) Filter: C, H, N, O, Br, Cl, As, S, RDB-Filter, $\Delta m_{\text{rel}} = \pm 5$ ppm, $v_{\text{CHetMin}} = 1$

b) Filter: wie a) und Isotopenmusterfilter: $I_{\text{corrin}} = 85$ %

c) Filter: wie b) und Konsistenzüberprüfung aller Fragmente mit dem Molekülion

Eine Zuordnung der bestimmten EK der Fragmente zu Strukturmerkmalen von Triphenylarsin kann aufgrund der Symmetrie des Moleküls leicht erfolgen. Es entstehen Fragmente mit einem (C₆), zwei (C₁₂) oder drei (C₁₈) Phenylringen, die jeweils ohne und mit einem Arsenatom auftreten.

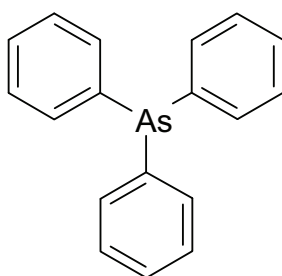


Abbildung 5.8: Strukturformel von Triphenylarsin (C₁₈H₁₅As)

6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von Algorithmen vorgestellt, die in ihrer Gesamtheit die Auswertung von hoch- und ultrahochaufgelösten Massenspektren wesentlich unterstützen. Voraussetzung für die vorgestellten Methoden ist die Möglichkeit der exakten Massenbestimmung, die eine kombinatorische Zuordnung möglicher EK zu einer Ionenmasse gestattet. Die exponentielle Komplexität der Summenformelbestimmung führt mit ansteigender Masse und einer zunehmenden Zahl kombinierter Elemente zu hohen Laufzeiten und einer anwachsenden Lösungsmenge. Durch Modifikation des rein kombinatorischen Algorithmusses konnten die Hauptisotope der Elemente Wasserstoff (^1H) und Kohlenstoff (^{12}C) von der Kombination ausgeschlossen werden. Da diese Isotope in organischen Verbindungen nahezu immer berücksichtigt werden müssen, kann der Rechenaufwand für die Bestimmung der EK dadurch nachweislich reduziert werden.

Für eine praxisorientierte Anwendung dieses Interpretationsansatzes muss die Anzahl der bestimmten EK so klein wie möglich sein. Deshalb wurden mehrere Filtermethoden beschrieben und evaluiert, deren Anwendung zu einer Reduktion der Lösungsmenge führt. Neben der Beschränkung des RDB-Äquivalents und des Verhältnisses der Anzahl der Kohlenstoff- zu den Heteroatomen in einer EK wird in einem weiteren Schritt das experimentelle Isotopenmuster mit den theoretischen Mustern der erzeugten EK verglichen und das Maß der Übereinstimmung (Korrelation) zur weiteren Reduktion der Lösungsmenge angewendet.

Für die Simulation des theoretischen Isotopenmusters einer EK werden drei Methoden vorgestellt. Mit der Polynominal-Methode ebenso wie mit der FFT-basierten Methode kann die Simulation unter Berücksichtigung der instrumentellen Auflösung durchgeführt werden. Dabei zeigt die FFT-Methode bei der Simulation komplexer Isotopenmuster biologischer Makromoleküle bzw. von Verbindungen mit sehr isotopenreichen Elementen Laufzeit- und Genauigkeitsvorteile gegenüber der Polynominal-Methode. Die Methode der diskreten Faltung fasst isobare Isotopenkonfiguration zusammen und ist deshalb den anderen beiden Methoden im Hinblick auf die Geschwindigkeit überlegen. Allerdings erzeugt diese Methode keine hoch- bzw. ultrahochaufgelösten Isotopenmuster. Um

die Berechnungszeit bei der Isotopenmustersimulation zu minimieren, ohne dabei auf eine Darstellung isobarer Isotopenkonfigurationen zu verzichten, wenn diese erforderlich ist, wird ein Verfahren beschrieben, mit dem in Abhängigkeit von der instrumentellen Auflösung die geeignete Simulationsmethode automatisch bestimmt werden kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Isotopenmusteranalyse ist die Zuordnung spektraler Peaks zu den Peaks eines simulierten Musters. Diese erfolgt unter Berücksichtigung auftretender Dubletts, sowie Peaks anderer Verbindungen im Bereich des untersuchten Isotopenmusters und ermöglicht dadurch die Interpretation ultrahochaufgelöster Isotopenmuster. Die Untersuchung des Filtereffekts ergab, dass der Isotopenmusterfilter besonders effizient bei der Bestimmung des Anteils derjenigen Elemente ist, die eine signifikante Isotopenverteilung aufweisen (Chlor, Brom, viele Metalle) und darum einen großen Einfluss auf das resultierende Muster einer Verbindung haben. Sofern die experimentelle Auflösung ausreichend ist, um isotopische Dubletts aufzulösen und die absolute Intensität des untersuchten Ions im Spektrum groß genug ist, kann auch das Vorkommen von Elementen mit geringerem Einfluss auf das Isotopenmuster (Schwefel, Sauerstoff, Stickstoff) nachgewiesen werden. Die Filterwirkung für das Element Kohlenstoff ist zumindest bei FTICR-MS, die eine relativ geringe Genauigkeit bei Intensitätsbestimmung aufweisen, relativ gering.

Unter der Voraussetzung, dass zwischen Mutter- und Tochterionen in einem Massenspektrum chemisch plausible Neutralverluste existieren müssen, wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Zusammengehörigkeit zwischen Mutterion und einem zugeordnetem Tochterion überprüft. Für Ionen, für die eine Verwandtschaft vorausgesetzt werden kann, wie z.B. für ein Molekülion und dessen Fragmente, dient die Konsistenzüberprüfung darüber hinaus zur weiteren Reduktion der EK aller beteiligten Ionen, was an einer Reihe von Beispielen demonstriert werden konnte. Am Beispiel der Substanz Reserpin wurde gezeigt, dass der Filtereffekt noch gesteigert werden kann, wenn auch die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Fragmenten einer Verbindung weiter charakterisiert werden können. Dazu sind im Allgemeinen zusätzliche MS^n -Experimente mit einer vorherigen Isolation des untersuchten Fragmentes notwendig.

Des Weiteren können die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Ionen einer Verbindung auch als mögliche Fragmentierungspfade interpretiert werden. Die graphische Darstellung des Fragmentierungsbaumes (Gesamtheit aller Pfade) erfolgt in einem Dendrogramm, das einen schnellen visuellen Eindruck über die möglichen Fragmentierungswege erlaubt und eine nachfolgende Interpretation des Spektrums im Hinblick auf die Strukturaufklärung unterstützt.

Abschließend soll auf einige Erweiterungen und Verbesserungsmöglichkeiten hingewiesen werden, die vor allem für die Auswertung von Massenspektren biologischer Makromoleküle relevant sind.

Durch die Einführung von makroelementaren Bausteinen (Makroelemente) in den Kombinationsprozess wird für biologische Makromoleküle eine Reduzierung der Lösungsmenge erwartet. Für die Analyse von RNS bzw. DNS könnte zum Beispiel anstatt mit den chemischen Elementen auch mit den vier Nukleotiden kombiniert werden [233].

In ESI-Spektren treten Ionen mit einer Masse von mehr als 1000 Da zunehmend mehrfachgeladen auf. Mehrfachgeladene Ionen können zurzeit nicht direkt ausgewertet werden. Dies würde eine Modifizierung der Auswertalgorithmen oder eine zusätzliche Implementierung eines Entfaltungsalgorithmusses erforderlich machen [199, 200]. Weiterhin kann für schwere Moleküle häufig kein monoisotopischer Peak mehr nachgewiesen werden, der für die kombinatorische Bestimmung der EK eines Ions erforderlich ist. Allerdings könnte die Bestimmung der EK auch für die, aus einem experimentellen Isotopenmuster ermittelbare, chemische Masse erfolgen, wenn anstatt mit den exakten Isotopenmassen, mit den chemischen Massen der Elemente kombiniert wird [205].

7. Summary

In this work a number of algorithms were presented, which support the evaluation of high and ultra high resolved mass spectra. Prerequisite for the presented methods is the determination of exact ion masses, which allows the combinatorial assignment of elemental compositions for these masses. The exponential complexity of this problem leads with increasing mass and a rising number of combined elements to long runtimes and a growing solution set. By modification of the simple combinatorial algorithm the main isotopes of Hydrogen (^1H) and Carbon (^{12}C) could be excluded from the combination process. Because these isotopes are mostly contained in organic compounds the effort for the determination of the elemental compositions can be demonstrable reduced.

For a useful application of this interpretation approach the number of the assigned elemental compositions has to be as small as possible. Therefore, several filter methods are described, whose application reduces the solution set. Apart from the restriction of the degree of unsaturation and the rate of the number of carbon- to heteroatoms in an elemental composition, the experimental isotope pattern is compared with the simulated pattern of the determined elemental compositions. The degree of conformity is used for a further reduction of the solution set.

Three methods are described for the simulation of the theoretical pattern of an elemental composition. With the Polynomial- and the FFT-based method the simulation can be performed with respect to the instrumental resolution. For isotopic complex molecules (biological macromolecules and isotope rich compounds) the FFT-method shows advantages in runtime and accuracy compared with the Polynomial-method. With the discrete convolution method isobaric isotope configurations are summarized and therefore this method is superior with regard to runtime indeed this method doesn't generate high and ultrahigh resolved isotope patterns.

To minimize the runtime of isotope pattern simulation without resigning the representation of isobaric isotope configurations, if it is required, an approach for the automatic selection of the proper simulation method depending on the instrumental resolution is described. The assignment of spectral peaks to a simulated pattern is a

further important step of the isotope pattern analysis. It is performed with respect to the occurrence of duplets and peaks of other compounds in the area of the evaluated isotope pattern and thus enables the interpretation of ultrahigh resolved isotope patterns. The examination of the filter effect shows that it is highly efficient for the determination of the number of isotopic significant elements (chlorine, bromine, many metals) which have a high influence on the resulting pattern of a compound. If the experimental resolution is sufficient to resolve isotopic duplets and the intensity is high enough, the appearance of elements with lower influence to the isotope pattern (sulfur, oxygen, nitrogen) can be verified. At least for FTICR-MS the filter effect for the element carbon is relatively small because it has a lower accuracy in the determination of intensities.

Due to the requirement that chemical plausible neutral losses have to exist between mother- and daughter ions, a procedure was developed, which validates the coherence between the elemental compositions of mother and daughter ions. As could be demonstrated for several examples, the consistency check serves for the further reduction of the elemental compositions of all participated ions, if a kinship between these ions can be expected, e.g. for a molecule ion and its fragments. For the compound Reserpin it was shown, that the filter effect can be increased if the relations between the fragment ions of a compound can be further characterized. In most cases further MS^n -experiments with an isolation of the examined fragment ions are required to gain the parent-child relationship information of the fragments.

Furthermore the relations between ions can be interpreted as possible fragmentation paths. For the graphical representation of such a fragmentation tree (the totality of all paths) dendrograms are used, which give a fast visual impression over all possible fragmentation paths and support a following structural interpretation.

8. Anhang A: Material und Methoden

8.1. Software

Xmass: Aquisitions- und Prozessierungssoftware für FTICR-MS der Apex-Serie, Version 6.1.2 und Version 7.0.8., Fa. Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland.

IsoPro (*Isotopic abundance simulator*): Isotopenmuster-Simulationsprogramm, Version 3.0, PC-Version von Senko, M. W.; *Department of chemistry, Cornell University*, Ithaca, NY 14853, USA

Microsoft Visual C++®: Entwicklungsumgebung, Version 6.0, Fa. *Microsoft Corporation*, Redmond, USA.

Microsoft Visual Studio .NET®: Entwicklungsumgebung, Version 7.0, Fa. *Microsoft Corporation*, Redmond, USA.

8.2. Massenspektrometer

FTICR-MS: Für die Aufnahme der FTICR-MS-Spektren wurde ein APEX III FTICR-MS der Fa. Bruker Daltonik, Bremen, Germany mit einem supraleitenden 7 T Magneten verwendet. Es standen drei Ionisierungsquellen zur Verfügung: eine APCI/ESI-, eine MALDI- und eine EI/CI-Quelle. Als Desolvations- und Spraygas bei ESI wurde Stickstoff verwendet, der mit einem Stickstoffgenerator (LCMS 18, Fa. Domnick Hunter, Willich, Germany) aus Druckluft erzeugt wurde. Die Infusion erfolgte direkt mit einer Spritzenpumpe (74900-05, Fa. Cole-Parmer, Vernon Hills, USA) oder indirekt mit einem in das System integrierten Probenvorbereitungsroboter HTS-Pal der FA. CTC, Zwingen, Schweiz mit einer Flussrate von 2 µl/min. Als Kollisionsgas bei MSⁿ-Experimenten diente Argon. Es wurden 1024 Ki Datenpunkte pro Messung aufgenommen. Für ein Spektrum wurden 8 bis 64 Messungen aufsummiert.

9. Anhang B: Dateiformate

9.1. Spezifikation des ASCII-Formates für Addukt- und Clusterionen

9.1.1. Zweck

Dieses Format dient der Definition und Speicherung von Addukt- und Clusterionen für die Suche nach Molekülonen in API-MS-Spektren.

9.1.2. Verzeichnis und Dateiendung

Die Dateien für die Definition von Addukt- und Clusterionen befinden sich im Verzeichnis: "...\\Installationsverzeichnis\\initdata\\". Alle Dateien mit der Endung „*.mel“ die der geforderten Syntax entsprechen werden beim Programmstart eingelesen.

9.1.3. Syntax

```
[GROUPNAME] Positive Species
# Elements      H C N O F Na S  Cl K  Br Cs
[ATOMIC NUMBERS] 1 6 7 8 9 11 16 17 19 35 55
```

```
#          H C N O F N S C K B C
```

```
[SYMBOL] M+3H
[INDEX]  3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
[CHARGE] 3
[MFACTOR] 1
[VALUE] 1.5
```

```
[SYMBOL] M+2H+Na
[INDEX]  2 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0
[CHARGE] 3
[MFACTOR] 1
[VALUE] 1.0
```

```
...
...
...
```

```
[GROUPNAME] Negative Species
# Elements      H C N O F Na S  Cl K  Br Cs
[ATOMIC NUMBERS] 1 6 7 8 9 11 16 17 19 35 55
```

```
#          H C N O F N S C K B C
```

```
[SYMBOL] M-3H
[INDEX] -3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
[CHARGE] -3
```

```

[MFACOR] 1
[VALUE] 1.0

[SYMBOL] M-2H
[INDEX] -2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
[CHARGE] -2
[MFACOR] 1
[VALUE] 1.5

...
...
...

```

9.1.4. Beschreibung

Die Definition eines neuen Cluster- oder Adduktions beginnt mit dem *Token* [Symbol]. Jedes *Token* ist von seinem Wert durch mindestens ein *Whitespace* (Leerzeichen, Tabulator) getrennt. Jedes *Token* steht in einer separaten Zeile. Die Reihenfolge der *Token* kann Abschnitt 9.1.3 entnommen werden. Leerzeilen sind erlaubt. Die Definition eines Cluster- oder Adduktions ist nur gültig, wenn zuvor eine Gruppe ([GROUPNAME]) und die der Gruppe zugehörigen Ordnungszahlen ([ATOMIC NUMBERS]) definiert worden sind. Die Anzahl der Addukt- und Clusterionen einer Gruppe ist unbegrenzt, allerdings müssen die Symbole in einer Gruppe eindeutig sein.

Tabelle 9.1: *Token* zu Deklaration von Addukt- und Clusterionen

<i>Token</i>	Bedeutung	Datentyp und Beschränkungen
#	Kommentar	unbeschränkt
[GROUPNAME]	Definiert eine neue Gruppe Ordnungszahlen der Elemente	max. 300 Zeichen
[ATOMIC NUMBERS]	einer Gruppe, folgt direkt auf Gruppendefinition	Integer, max. 130
[SYMBOL]	Angezeigtes Symbol des Addukt- oder Clusterions, Beginn der Deklaration eines neuen Cluster- oder Adduktions	max. 10 Zeichen
[INDEX]	Indizes der unter [ATOMIC NUMBERS] derselben Gruppe definierten Elemente	Anzahl muss mit der Anzahl der Ordnungszahlen der Gruppe übereinstimmen
[CHARGE]	Ladung	Integer
[MFACOR]	Cluster Faktor	Integer
[VALUE]	Wertung	gebrochenrationale Zahl

9.2. Spezifikationen des ASCII-Formates der Peaklisten

9.2.1. Zweck

Die Peaklisten ermöglichen es, einem Projekt die prozessierten und reduzierten Daten eines Massenspektrums in Form einer Peakliste hinzuzufügen.

9.2.2. Syntax

465.1034985	2217728.0000000
466.1070225	4445184.0000000
585.2153226	7233792.0000000
611.1612650	43484160.0000000
612.1651629	10977536.0000000

9.2.3. Beschreibung

Jede gültige Zeile enthält eine Peakmasse gefolgt von deren Intensität. Intensität und Masse sind durch mindestens ein *Whitespace* (Leerzeichen, Tabulator) voneinander zu trennen. Zeilen die nicht diesem Format entsprechen werden ignoriert.

9.3. Spezifikation des ASCII-Formates der PSE⁴⁹ Datei: „periodic.tab“

9.3.1. Zweck

Die Ordnungszahlen, die Symbole, die Anzahl der Isotope und die Hauptwertigkeiten aller chemischen Elemente, sowie die exakten Massen und Auftrittswahrscheinlichkeiten von deren Isotopen werden in der Textdatei „periodic.tab“ gespeichert.

9.3.2. Verzeichnis und Dateieindung

Da die Informationen in der Datei „periodic.tab“ die Grundlage für alle Auswerteprozeduren sind, muss sie sich im Verzeichnis „...\\Installationsverzeichnis\\initdata\\“ befinden. Ist die Datei nicht vorhanden, kann das Programm nicht gestartet werden.

⁴⁹ PSE: Periodensystem der Elemente.

9.3.3. Syntax

```
#OZ   Anzahl der Isotope
*7     2
#Nominelle Masse und Symbol   exakte Masse   Häufigkeit   Wertigkeit
14N    14.003074005          0.996337      3
15N    15.000108898          0.003663      3

*8     3
16O    15.994914622          0.997590      2
17O    16.999131501          0.000374      2
18O    17.999160419          0.002036      2

*9     1
19F    18.998403205          1.0           1
```

9.3.4. Beschreibung

Die Informationen für jedes Element sind in je einem Block des folgenden Formats deklariert:

```
*<OZ> <Anzahl der Isotope>
<Nominelle Masse><Symbol> <exakte Masse> <relative Häufigkeit> <Wertigkeit>
```

Jeder Block beginnt mit einem „*“ direkt gefolgt von der Ordnungszahl (OZ). Die dem Element zugehörigen Isotope müssen in den nächsten Zeilen folgen. Ein Block wird durch mindestens eine Leerzeile vom nächsten getrennt. Jede Ordnungszahl darf nur einmal enthalten sein. Treten mehrere Blöcke mit derselben Ordnungszahl auf, wird nur der erste Block berücksichtigt. Zwischen jedem Eintrag muss mindestens ein *Whitespace* (Leerzeichen oder Tabulator) stehen. Zeilen, die mit „#“ beginnen, kennzeichnen Kommentare und werden, genauso wie Zeilen die nicht dem angegebenen Format entsprechen, ignoriert.

Literaturverzeichnis

- [1] Budzkiewicz, H.: *Massenspektrometrie: Eine Einführung*. 4. Ausgabe , Willey-VCH, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, **1998**.
- [2] Thomson, J. J.: *Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis*. Longmans, Green and Co. Ltd., London, **1913**.
- [3] Ham, J. E., Durham, B., Scott, J. R.: Comparison of Laser Desorption and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization for Ruthenium and Osmium Trisbipyridine Complexes Using Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14, 393-400.
- [4] Niedermeyer, T. H. J., Lindequist, U., Mentel, R., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., Lalk, M.: Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1728-1731.
- [5] Wolkenstein, K., Gross, J. H., Giesa, S., Schöler, H. F.: Nachweis eines Fringelit-Typ Farbstoffs in fossilen Seelilien der Art *Chelocrinus carnalli* mittels LR- und HR-ESI-MS. *Diskussionstagung der DGMS*, München, **2001**, Conference Proceeding.
- [6] Nawrocki, J. P., Wigger, M., Watson, C. H., Hayes, T. W., Senko, M. W., Benner, S. A., Eyster, J. R.: Analysis of Combinatorial Libraries Using Electrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1860-1864.
- [7] Escoubas, P., Chamot-Rooke, J., Stöcklin, R., Whiteley, B. J., Corzo, G., Genet, R., Nakajima, T.: A Comparison of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry Methods for the Analysis of Crude Tarantula Venoms in the Pterinochilus Group. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 1861-1868.
- [8] Albrecht, U., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., Lalk, M., Langer, P.: Synthesis and structure-activity relationships of 2-alkyldenethiazolidine-4,5-diones as antibiotic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 4402-4407.
- [9] Wu, Z., Jernström, S., Hughey, C. A., Rodgers, R. P., Marshall, A. G.: Resolution of 10,000 Compositionally Distinct Components in Polar Coal Extracts by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy & Fuels*, **2003**, 17, 946-953.
- [10] Wu, Z., Hendrickson, C. L., Rodgers, R. P., Marshall, A. G.: Composition of Explosives by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1879-1883.
- [11] Wu, Z.: Compositional Analysis of Complex Organic Mixtures by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *The Florida State University*, **2004**, These/Disseration.

- [12] Rodgers, R. P., Hendrickson, C. L., Emmett, M. R., Marshall, A. G., Greaney, M., Qian, K.: Molecular Characterization of Petroporphyrins In Crude Oil by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Can. J. Chem.*, **2001**, 79, 546-551.
- [13] Rodgers, R. P., Blumer, E. N., Freitas, M. A.: Jet Fuel Chemical Composition, Weathering, and Identification as a Contaminant at a Remediation Site, Determined by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 5171-5176.
- [14] Stenson, A. C., Marshall, A. G., Cooper, W. T.: Exact Mass and Chemical Formulas of Individual Suwannee River Fulvic Acids from Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1275-1284.
- [15] Jeyarajah, S., Parker, C. E., Sumner, M. T., Tomer, K. B.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Mass Spectrometry Mapping of Human Immunodeficiency Virus-gp120 Epitopes Recognized by a Limited Polyclonal Antibody. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 157-165.
- [16] Russell, D. H., Edmondson, R. D.: Characterization of Peptides and proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 263-276.
- [17] Strittmacher, E. F., Ferguson, P. L., Tang, K., Smith, R. D.: Proteome Analyses Using Accurate Mass and Elution Time Peptide Tags with Capillary LC Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14, 980-991.
- [18] Williams, J. D., Flanagan, M., Lopez, L., Fischer, S., Miller, L. A. D.: Using accurate mass electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry with in-source collision-induced dissociation to sequence peptide mixtures. *J. Chromatogr.*, **2003**, 1020, 11-26.
- [19] Russell, D. H., Edmondson, R. D.: High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 263-276.
- [20] Marvin, L. F., Roberts, M. A., Fay, L. B.: Matrix-assisted laser Desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **2003**, 337, 11-21.
- [21] Siuzdak, G.: *Mass spectrometry for biotechnology*. Academic Press, San Diego, **1996**.
- [22] Bullinger, D., Frickenschmidt, A., Pelzing, M., Zurek, G., Laufer, S., Zey, T., Kammerer, B.: Identification of Urinary Nucleosides by ESI-TOF-MS. *LCGC*, **2005**, 12.
- [23] Pieses, U., Zürcher, W., Schär, M., Moser, H. E.: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and

- sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3191-3196.
- [24] Somogyi, A., Oh, C. H., Lunine, J. I.: Organic Environments on Saturn's Moon, Titan: Simulating Chemical Reactions and Analyzing Products by FT-ICR and Ion-Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 850-859.
- [25] Murphy, R. C., Preti, G., Nafissi-V, M. M., Biemann, K.: Search for Organic Material in Lunar Fines by Mass Spectrometry. *Science*, **1970**, 167, 755-757.
- [26] De Hoffmann, E., Charette, J., Stroobant, V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Masson, Paris, Milan, Barcelona, **1999**.
- [27] Maccoll, A.: Low Energy, Low Temperature Mass Spectra 6-A Synoptic View. *Org. Mass Spectrom.*, **1986**, 21, 601-611.
- [28] McLafferty, F. W. T. F.: *Interpretation von Massenspektren*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.
- [29] Munson, M. S. B., Field, F. H.: Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 2621-2630.
- [30] Fenn, J. B.: Elektrospray: Molekulare Elefanten lernen das Fliegen (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 3999-4024.
- [31] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B.: Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 2240-2249.
- [32] Aleksandrov, M. L., Gall, L. N., Gall, L. N. K., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A., Shkurov, V. A.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **1984**, 277, 379-383.
- [33] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M.: Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, **1989**, 246, 64-71.
- [34] Palmblad, M.: Identification and Characterization of Peptides and Proteins using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Uppsala University*, **2002**, These/Disseration.
- [35] Kebarle, P.: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 804-817.
- [36] Siu, K. W. M., Guevremont, R., Le Blanc, J. C. Y., O'Brien, R. T., Bermann, S. S.: Is Droplet Evaporation Crucial in the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, 28, 579-584.
- [37] Ashton, D. S., Beddell, C. R., Cooper, D. J., Green, B. N., Oliver, R. W. A.: Mechanism of Production of Ions in Electrospray Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, 28, 721-728.

- [38] Blades, A. T., Ikonou, M. G., Kebarle, P.: Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. Electrospray as an Electrolysis Cell. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2109-2114.
- [39] Bruins, A. P.: Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry I. Instrumentation and ionization techniques. *trends anal. chem.*, **1994**, 13, 37-43.
- [40] Ikonou, M. G., Blades, A. T., Kebarle, P.: Investigations of the Electrospray Interface for Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 657-967.
- [41] Thomson, B. A.: Atmospheric Pressure Ionization and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Together at Last. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 187-193.
- [42] Constantopoulos, T. L., Jackson, G. S., Enke, C. G.: Effects of Salt Concentration on Analyte Response Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 625-634.
- [43] Märk, T. D.: Cluster Ions: Production, Detection and Stability. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1987**, 79, 1-59.
- [44] Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G., Meuzelaar, H. L. C.: Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules. *Anal. Chem.*, **1978**, 50, 985-991.
- [45] Karas, M., Hillenkamp, F.: Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301.
- [46] Tanaka, K.: Ionisation von Makromolekülen durch Bestrahlung mit Laserlicht (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 3989-3998.
- [47] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Yoshida, Y.: Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153.
- [48] Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F.: Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 241, 175-185.
- [49] Fitzgerald, M. C., Parr, G. R., Smith, L. M.: Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3204-3211.
- [50] Overberg, A., Karas, M., Bahr, U., Kaufmann, R., Hillenkamp, F.: Matrix-assisted infrared-laser (2.49 μm) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1990**, 4, 293-296.
- [51] Berkenkamp, S., Kirpekar, F., Hillenkamp, F.: Infrared MALDI Mass Spectrometry of Large Nucleic Acids. *Science*, **1998**, 281, 260-262.

- [52] Overberg, A., Karas, M., Hillenkamp, F.: Matrix-assisted Laser Desorption of Large Biomolecules with a TEA-CO₂-Laser. *Rapid Comm. Mass Spectrom*, **1991**, 5, 128-131.
- [53] Ehring, H., Karas, M., Hillenkamp, F.: Role of photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 472-480.
- [54] Knochenmuss, R., Dubois, F., Dale, M. J., Zenobi, R.: The Matrix Supression Effect and Ionization Mechanism in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Comm. Mass Spectrom*, **1996**, 10, 871-877.
- [55] Zenobi, R., Knochenmuss, R.: Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, 17, 337-366.
- [56] Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J.: Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 1-12.
- [57] Muddiman, D. C., Gusev, A. I., Herules, D. M.: Application of Secondary Ion and Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Quantitative Analysis of Biological Molecules. *Mass Spectrom. Rev.*, **1995**, 14, 383-429.
- [58] Krutchinski, A. N., Chait, B. T.: On the nature of the Chemical Noise in MALDI Mass Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2002**, 13, 129-134.
- [59] Stevenson, T. I., Loo, J. A., Greis, K. D.: Coupling Capillary High-Performance Liquid Chromatography to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and N-Terminal Sequencing of Peptides via Automated Microblotting onto Membran Substrates. *Anal. Biochem.*, **1998**, 262, 99-201.
- [60] Barber, M., Bordoli, R. S., Tyler, A. N.: Fast atom bombardment of solids (FAB): a new ion source for mass spectrometry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 325-327.
- [61] Barber, M., Bordoli, R. S., Elliot, G. J., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N.: Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 645-657.
- [62] Devienne, F. M., Roustan, J.-C.: "Fast Atom Bombardment" - A Rediscovered Method for Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **1982**, 17, 173-181.
- [63] Beckey, H. D.: Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1969**, 2, 500-503.
- [64] Schulten, H.-R.: Biochemical, Medical, and Environmental Applications of Field-Ionization and Field-Desorption Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1979**, 32, 97-283.

- [65] Wood, G. W.: Field desorption mass spectrometry: Applications. *Mass Spectrom. Rev.*, **1982**, 1, 63-102.
- [66] MacFarlane, R. D., Torgerson, D. F.: Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science*, **1976**, 191, 920-925.
- [67] Juraschek, R., Dülcks, T., Karas, M.: Nanoelectrospray - More Than Just a Minimized-Flow Electrospray Ionization Source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 300-308.
- [68] Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G.: Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science*, **2004**, 306, 471-473.
- [69] Cooks, R. G., Quyang, Z., Takats, Z., Wiseman, J. M.: Ambient Mass Spectrometry. *Science*, **2006**, 311, 1566-1570.
- [70] Li, Y. L., Gross, M. L.: Ionic-Liquid Matrices for Quantitative Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 1833-1837.
- [71] Li, Y. L., Gross, M. L., Hsu, F. F.: Ionic-Liquid Matrices for Improved Analysis of Phospholipids by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 679-682.
- [72] Laiko, V. V., Baldwin, M. A., Burlingame, A. L.: Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 652-657.
- [73] Kellersberger, K. A., Yu, E. T., Merenbloom, S. I., Fabris, D.: Atmospheric Pressure MALDI-FTMS of Normal and Chemically Modified RNA. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 199-207.
- [74] Daniel, J. M., Ehala, S., Friess, S. D., Zenobi, R.: On-line atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analyst*, **2004**, 129, 574-578.
- [75] Hanton, S. D., Parees, D. M.: Extending the Solvent-Free MALDI Sample Preparation Method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 90-93.
- [76] Trimpim, S., Deinzer, M. L.: Solvent-free MALDI-MS for the Analysis of Biological Samples via a Mini-Ball Mill Approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 542-547.
- [77] Kienitz, H.: *Massenspektrometrie*. Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1968**.
- [78] Nier, A. O.: A Double-Focusing Mass Spectrometer. *Natl. Bur. Standards*, **1953**, 29, 522.
- [79] Stephens, W. E.: A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 691.

- [80] Cameron, A. E., Eggers, D. F.: An Ion "Velocitron". *Rev. Sci. Instrum.*, **1948**, 19, 605-607.
- [81] Guilhaus, M.: Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 1519-1532.
- [82] Cotter, R. J.: *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*. American Chemical Society, Washington DC, **1997**.
- [83] Mamyrin, B. A., Karatajev, V. J., Shmikk, D. V., Zagulin, V. A.: The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys. JETP*, **1973**, 37, 45-48.
- [84] Wiley, W. C., McLaren, I. H.: Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.*, **1955**, 26, 1150-1157.
- [85] Vestal, M. L., Juhasz, P., Martin, S. A.: Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom*, **1995**, 9, 1044-1050.
- [86] Brown, R. S., Lennon, J. J.: Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1998-2003.
- [87] Kovtoun, S. V., English, R. D., Cotter, R. J.: Mass Correlated Acceleration In a Reflectron MALDI TOF Mass Spectrometer: An Approach for Enhanced Resolution Over a Broad Mass Range. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2002**, 13, 135-143.
- [88] Guilhaus, M., Mlynski, V., Selby, D.: Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom*, **1997**, 11, 951-962.
- [89] Guilhaus, M., Selby, D., Mlynski, V.: Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **2000**, 19, 65-107.
- [90] Lawrence, E. O., Livingston, M. S.: The Production of High Speed Light Ions without the Use of High Voltages. *Phys. Rev.*, **1932**, 40, 19-35.
- [91] Penning, F. M.: *Physica (Utrecht)*, **1936**, III, 873-894.
- [92] Guan, S., Marshall, A. G.: Ion traps for Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry: principles and design of geometric and electric configuration. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1995**, 146, 261-296.
- [93] Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., Jackson, S. J.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, 17, 1-35.
- [94] Guan, S., Huang, Y., Xin, T., Marshall, A. G.: Determination of Ion Magnetron Radial Distribution in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1855-1859.

- [95] Fourier, J. B. J.: *Théorie analytique de la chaleur*. Chez Firmin Didot, Père et Fils, Paris, **1822**.
- [96] Comisarow, M. B., Marshall, A. G.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **1974**, 25, 282-283.
- [97] Cooley, J. W., Tukey, J. W.: An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Math. Comp.*, **1965**, 19, 297-301.
- [98] Guan, S., Marshall, A. G.: Stored waveform inverse Fourier transform (SWIFT) ion excitation in trapped-ion mass spectrometry: theory and applications. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1996**, 157, 5-37.
- [99] Marshall, A. G., Roe, D. C.: Theory of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Response to frequency-sweep excitation. *J. Chem. Phys.*, **1980**, 73, 1581-1890.
- [100] Marshall, A. G., Wang, T.-C. L., Ricca, T. L.: Tailored Excitation for Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7893-7897.
- [101] Curbelo, R.: *Fourier Transformation and Sampling Theory. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Academic Press, Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, **2000**, 623 ff.
- [102] Marshall, A. G., Schweikhard, L.: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: technique developments. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1992**, 118, 37-70.
- [103] Ledford, E. B., Rempel, D. L., Gross, M. L.: Space Charge Effects in Fourier Transform Mass Spectrometry. Mass Calibration. *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 2744-2748.
- [104] Marshall, A. G.: Ion Cyclotron Resonance and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopies: Magnetic Partners for Elucidation of Molecular Structure and Reactivity. *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 307-319.
- [105] Marshall, A. G., Grosshans, P. B.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: The Teenage Years. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 215A-229A.
- [106] Marshall, A. G.: Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **2000**, 200, 331-356.
- [107] Amster, I. J.: Tutorial: Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1996**, 31, 1325-1337.
- [108] Witt, M., Fuchser, J., Baykut, G.: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry with NanoLC/Microelectrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: Analytical Performance in Peptide Mass Fingerprint Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14, 553-561.

- [109] Shi, S. D. H., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G.: Counting individual sulphur atoms in a protein by ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 11532-11537.
- [110] Marshall, A. G., Guan, S.: Advantages of High Magnetic Field for Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1819-1823.
- [111] Clerc, J.-T., Erni, F., Jost, C., Nügeli, P., Schwarzenbach, R.: Computerunterstützte Spektreninterpretation zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. *Z. Anal. Chem.*, **1973**, 264, 192-195.
- [112] McLafferty, F. W., Stauffer, D. B., Loh, S. Y.: Comparative Evaluations of Mass Spectral Data Bases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1991**, 2, 438-440.
- [113] McLafferty, F. W., Stauffer, D. B., Twiss-Brooks, A. B., Loh, S. Y.: An Enlarged Data Base of Electron-Ionization Mass Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1991**, 2, 432-437.
- [114] Stein, S. E., Ausloos, P., Lias, S. G.: Comparative Evaluation of Mass Spectral Databases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1991**, 2, 441-443.
- [115] Ausloos, P., Clifton, C. L., Lias, S. G., Mikaya, A. I., Stein, S. E., Tchekhovskoi, D. V., Sparkmann, O. D., Zaikin, V., Zhu, D.: The Critical Evaluation of a Comprehensive Mass Spectral Library. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 287-299.
- [116] Henneberg, D., Weimann, B., Zalfen, U.: Computer-aided Interpretation of Mass Spectra Using Databases with Spectra and Structures. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, 28, 198-206.
- [117] Pretsch, E., Clerc, J.-T., Bendl, J.: Spectroscopic data banks. *Z. Anal. Chem.*, **1986**, 324, 714-719.
- [118] Varmuza, K.: Interpretation niedrig aufgelöster Massenspektren durch Klassifikation mit Hilfe der Nachbarspektren aus einer Bibliothek. *Z. Anal. Chem.*, **1974**, 268, 352-356.
- [119] Weinmann, W., Wiedemann, A., Eppinger, B., Renz, M., Svoboda, M.: Screening for Drugs in Serum by Electrospray Ionization/Collision-Induced Dissociation and Library Searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 1028-1037.
- [120] Hough, J. M., Haneey, C. A., Voyksner, R. D., Bereman, R. D.: Evaluation of electrospray transport CID for the generation of searchable libraries. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 2265-2270.
- [121] Hopley, C., Bristow, T., Lubben, A., Simpson, A., Bull, E., Klagkou, K., Herniman, J., Langley, J.: Reproducibility of product ion MS Spectra - Towards a universal product ion MS library. *17th International Mass Spectrometry Conference*, Prague, **2006**, Conference Proceeding.

- [122] Atwater, B. L., Stauffer, D. B., McLafferty, F. W.: Reliability Ranking and Scaling Improvements to the Probability Based Matching System for Unknown Mass Spectra. *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 899-903.
- [123] Stauffer, D. B., McLafferty, F. W., Ellis, R. D., Peterson, D. W.: Probability-Based-Matching Algorithm with Forward Searching Capabilities for Matching Unknown Mass Spectra of Mixtures. *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1056-1060.
- [124] Damen, H., Henneberg, D., Weimann, B.: Siscom - A New Library Search System for Mass Spectra. *Anal. Chim. Acta*, **1978**, 103, 289-302.
- [125] Domokos, L., Henneberg, D., Weimann, B.: Optimization of Search Algorithms for a Mass Spectra Library. *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 150, 37-44.
- [126] Dayringer, H. E., Pesyna, G. M., Venkataraghavan, R., McLafferty, F. W.: Computer-Aided Interpretation of Mass Spectra: Information on Substructural Probabilities from Stirs. *Org. Mass Spectrom.*, **1976**, 11, 529-542.
- [127] Haraki, K. S., Venkataraghavan, R., McLafferty, F. W.: Prediction of Substructures from Unknown Mass Spectra by the Self-Training Interpretive and Retrieval System. *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 386-392.
- [128] McLafferty, F. W., Cheng, S., Dully, K. M., Guo, C.-J., Mun, I. K., Peterson, D. W., Russo, S. O., Salvucci, D. A., Serum, J. W., Staedeli, W., Stauffer, D. B.: Matching Mass Spectra Against a Large Data Base During GC/MS Analysis. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1983**, 47, 317-319.
- [129] Mun, I. K., Venkataraghavan, R., McLafferty, F. W.: Computer Prediction of Molecular Weights from Mass Spectra. *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 179-182.
- [130] Kwok, K.-S., Venkataraghavan, R., McLafferty, F. W.: Computer-Aided Interpretation of Mass Spectra. A Self-Training Interpretive and Retrieval System. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 4185-4194.
- [131] Lohninger, H., Varmuza, K.: Selective Detection of Classes of Chemical Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry/Pattern Recognition: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Alkanes. *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 236-244.
- [132] McLafferty, F. W., Stauffer, D. B.: Retrieval and Interpretative Computer Programs for Mass Spectrometry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1985**, 25, 245-252.
- [133] Tyler, A. N., Clayton, E., Green, B. N.: Exact Mass Measurement of polar organic Molecules at low Resolution using Electrospray Ionization and a Quadrupole Mass Spectrometer. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3561-3569.
- [134] Biemann, K., McMurray, W.: Computer-Aided Interpretation of High Resolution Mass Spectra. *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 6, 647-653.
- [135] McMurray, W., Greene, B. N., Lipsky, S. R.: Fast Scan High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1966**, 38, 1194-1204.

- [136] Rodgers, R. P., Blumer, E. N., Freitas, M. A., Marshall, A. G.: Compositional Analysis for Identification of Arson Accelerants by Electron Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Forensic Sci.*, **2001**, 46, 268-279.
- [137] Rodgers, R. P., White, F. M., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G.: Resolution, Elemental Composition, and Simultaneous Monitoring by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Organosulfur Species before and after Diesel Fuel Processing. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 4743-4750.
- [138] Manda, K., Gördes, D., Mikolasch, A., Hammer, E., Schmidt, E., Thurow, K., Schauer, F.: Cross-coupling of aromatic substrates with the solvents water, methanol, and other alcohols by laccase - a new way for derivatization of hydroxylated compounds. *Biotechn. Progr.*, **2006**.
- [139] Tunnicliff, D. D., Wadsworth, P. A., Schissler, D. O.: Ordered Exact Mass and Abundance Tables for Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1965**, 37, 543-548.
- [140] Damrau, A.: Computergestützte Auswertung in der Massenspektrometrie. *Universität Rostock*, **1996**, These/Disseration.
- [141] Robertson, A. L., Hamming, M. C.: MASSFORM: A Computer Program for the Assignment of Elemental Compositions to High Resolution Mass Spectral Data. *Biomedical Mass Spectrometry*, **1977**, 4, 203-207.
- [142] Dromey, R. G., Foyster, G. T.: Calculation of Elemental Compositions from High Resolution Mass Spectral Data. *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 394-398.
- [143] Schmidt, E.: Präzisionsmassenbestimmungen mit hochauflösenden und höchstauflösenden Massenspektrometern. *Universität Rostock*, **2003**, These/Disseration.
- [144] Mun, I. K., Venkataraghavan, R., McLafferty, F. W.: Computer Assignment of Elemental Composition of Mass Spectral Peaks from Isotopic Abundances. *Anal. Chem.*, **1977**, 49, 1723-1726.
- [145] Varmuza, K.: Automatische Erkennung von Isotopenpeakmustern in Massenspektren. *Z. Anal. Chem.*, **1985**, 322, 170-174.
- [146] Heuerding, S., Clerc, J. T.: Simple tools for the computer-aided interpretation of mass spectra. *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, **1993**, 20, 57-69.
- [147] Evans, J. E., Jurinski, N. B.: Program ELAL: An Interactive Minicomputer Based Elemental Analysis of Low and Medium Resolution Mass Spectra. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 961-963.
- [148] Crawford, L. R., Morrison, J. D.: Computer Methods in Analytical Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1971**, 43, 1790-1795.

- [149] Kavanagh, P. E.: Programm for Elemental Analysis Using Low or Medium Resolution Mass Spectra. *Org. Mass Spectrom.*, **1980**, 15, 334-335.
- [150] Crawford, L. R.: A General Calculation of the Ionic Formulae and Mono-Isotopic Spectrum of Low Resolution Mass Spectra. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1972**, 10, 279-292.
- [151] Boone, B., Mitchum, R. K., Scheppele, S. E.: Computer Analysis of Low Resolution Mass Spectra Correction for Natural Abundance of ^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{17}O and ^{18}O . *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1970**, 5, 21-27.
- [152] Tenhosaari, A.: Computer-assisted Composition Analysis of Unknown Compounds by Simultaneous Analysis of the Intensity Ratios of Isotope Patterns of the Molecular Ion and Daughter Ions in Low-resolution Mass Spectra. *Org. Mass Spectrom.*, **1988**, 23, 236-239.
- [153] Coursey, J. S., Schwab, D. J., Dragoset, R. A.: Isotope Masses and Abundances. *National Institute of Standards*, <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/>, **2006**.
- [154] Varmuza, K., Krenmayr, P.: Berechnung von Isotopenpeakintensitäten in Massenspektren. *Monatshefte für Chemie*, **1972**, 103, 1055-1063.
- [155] Bronstein, I. N., Semendjajew, K. A., Musiol, G., Mühlig, H.: *Taschenbuch der Mathematik*. 3., überarb. und erw. Aufl. der Neubearb. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun, **1997**.
- [156] Genty, C.: Application of a Statistical Method to Isotopic Analysis. *Anal. Chem.*, **1973**, 45, 505-511.
- [157] Hibbert, D. B.: A Prolog Program for the Calculation of Isotope Distributions in Mass Spectrometry. *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, **1989**, 6, 203-212.
- [158] Yergey, J.: A General Approach to Calculating Isotopic Distributions for Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1983**, 57, 337-349.
- [159] Yergey, J., Heller, D., Hansen, G., Cotter, R. J., Fenselau, C.: Isotopic Distribution in Mass Spectra of Large Molecules. *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 353-356.
- [160] Sukharev, Y. N., Sizoi, V. F., Nekrasov, Y. S.: The Computer Processing and Interpretation of Mass Spectral Information VI-Computing the Isotopic Spectrum of Assumed Composition. *Org. Mass Spectrom.*, **1981**, 16, 23-25.
- [161] Senko, M. W.: IsoPro (Isotopic abundance simulator). Version: 3.0, *Department of chemistry, Cornell University, Ithaca, NY 14853*, <http://members.aol.com/msmssoft/ISOPRO30.HTM>, **1998**.
- [162] Roussis, S. G., Proulx, R.: Reduction of Chemical Formulas from the Isotopic Peak Distributions of High-Resolution Mass Spectra. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1470-1482.

- [163] Katwijk, J. V.: Improved Evaluation of High-Resolution Mass Spectra Through the Investigation of Peak Shapes and Isotopic Contributions I. Simulation of Peak Shapes. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1981**, 39, 273-286.
- [164] Grange, A. H., Brumley, W. C.: A Mass Peak Profile Generation Model to Facilitate Determination of Elemental Compositions of Ions Bases an Exact Masses and Isotopic Abundances. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8, 170-182.
- [165] Werlen, R. C.: Effect of Resolution on the Shape of Mass Spectra of Proteins: Some Theoretical Considerations. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 976-980.
- [166] Rockwood, A. L.: Relationship of Fourier Transforms to Isotope Distribution Calculations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 103-105.
- [167] Rockwood, A. L., Van Orden, S. L., Smith, R. D.: Rapid Calculation of Isotope Distributions. *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2699-2704.
- [168] Rockwood, A. L., Van Orden, S. L., Smith, R. D.: Ultrahigh Resolution Isotope Distribution Calculations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 54-59.
- [169] Rockwood, A. L., Van Orden, S. L.: Ultrahigh-Speed Calculation of Isotope Distributions. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2027-2030.
- [170] Press, W., Teukolsky, S. A., Flannery, B. P.: *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, New York, **2002**.
- [171] Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., Nelson, G. J.: Dissociation of Individual Isotopic Peaks: Predicting Isotopic Distributions of Product Ions in MSⁿ. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14, 311-322.
- [172] Kubinyi, H.: Calculation of isotope distribution in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem. *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 247, 107-119.
- [173] Rockwood, A. L., Orman, J. R. V., Dearden, D. V.: Isotopic Compositions and Accurate Masses of Single Isotopic Peaks. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 12-21.
- [174] Rockwood, A. L., Haimi, P.: Efficient Calculation of Accurate Masses of Isotopic Peaks. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17, 415-419.
- [175] Heumann, K. G., Gallus, S. M., Rädlinger, G., Vogl, J.: Precision and accuracy in isotopic ratio measurements by plasma source mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1998**, 13, 1001-1008.
- [176] Easterling, M. L., Amster, I. J., Rooij, G. J., Heeren, R. M. A.: Isotope Beating Effects in the Analysis of Polymer Distributions by Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 1074-1082.
- [177] Bresson, J. A., Anderson, G. A., Bruce, J. E., Smith, R. D.: Improved Isotopic Abundance Measurements for High Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron

- Resonance Mass Spectra via Time-Domain Data Extraction. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 799-804.
- [178] Vieth, A.: Anwendung stabiler Isotope zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe in kontaminierten Aquiferen. *Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*, **2003**, These/Disseration.
- [179] Pommerantz, S. C., Märk, T. D.: Fractional Mass Values of Large Molecules. *Org. Mass Spectrom.*, **1987**, 22, 251-253.
- [180] Beavis, R. C.: Chemical Mass of Carbon in Proteins. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 496-497.
- [181] Gross, H. J.: Massenspektrometrie. Script zum Kurs "Spektroskopische Methoden in der Anorganischen und Organischen Chemie". *Universität Heidelberg*, **2003**, These/Disseration.
- [182] Editors: Guidelines for authors. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 7A-11A.
- [183] Gross, M. L.: Accurate Masses for Structure Confirmation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 57.
- [184] Busch, K. L.: Using Exact Mass Measurements. *Spectroscopy*, **1994**, 9, 21-22.
- [185] Bruce, J. E., Anderson, G. A., Wen, J., Harkewicz, R., Smith, R. D.: High-Mass-Measurement Accuracy and 100% Sequence Coverage of Enzymatically Digested Bovine Serum Albumin from ESI-FTICR Mass Spectrum. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2595-2599.
- [186] Hernimann, j. M., Langley, G. J., Bristow, T. W. T., O'Connor, G.: The Validation of Exact Mass Measurements for Small Molecules Using FT-ICRMS for Improved Confidence in the Selection of Elemental Formuals. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 1100-1108.
- [187] Wong, R. L., Amster, I. J.: Sub Part-Per-Million Mass Accuracy by Using Stepwise-External Calibration in Fourier Transform Ion cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17, 1681-1691.
- [188] Wu, J., Fannin, S. T., Franklin, M. A., Molinski, T. F., Lebrilla, C. B.: Exact Mass Determination for Elemental Analysis of Ions Produced by Matrix-Assisted Laser Desorption. *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3788-3792.
- [189] Pellegrin, V.: Molecular Formulas of Organic Compounds: The Nitrogen Rule and Degree of Unsaturation. *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 626-633.
- [190] Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L.: Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3573-3580.

- [191] McIntyre, D.: Using the Agilent LC/MSD TOF to identify Unknown Compounds. *Agilent Technologies Application Note*, **2004**.
- [192] Hobby, K., Leavens, B.: The Use of Isotope Ratio Measurements to Reduce the Number of Candidate Elemental Compositions from Accurate Mass Determination. *17th International Mass Spectrometry Conference*, Prague, **2006**, 107, Conference Proceeding.
- [193] Kind, T., Fiehn, O.: Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, **2006**, 7, 234-244.
- [194] Schmidt, E., Thurow, K.: "Mass Spectral": A Software Program for the Evaluation of High Resolution Mass Spectral Data. *17th International Mass Spectrometry Conference*, Prague, **2006**, 226, Conference Proceeding.
- [195] Tong, H., Bell, D., Tabei, K., Siegel, M. M.: Automated Data Massaging, Interpretation, and E-Mailing Modules for high Throughput Open Access Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 1174-1187.
- [196] Mann, M., Meng, C. K., Fenn, J. B.: Interpreting Mass Spectra of Multiply Charged Ions. *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1702-1708.
- [197] Henry, K. D., McLafferty, F. W.: Electrospray Ionization with Fourier-Transform Mass Spectrometry. Charge State Assignment from Resolved Isotopic Peaks. *Org. Mass Spectrom.*, **1990**, 25, 490-492.
- [198] Reinhold, B. B., Reinhold, V. N.: Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Deconvolution by an Entropy-Based Algorithm. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3, 207-215.
- [199] Senko, M. W., Beu, S. C., McLafferty, F. W.: Automated Assignment of Charge States from Resolved Isotopic Peaks for Multiply Charged Ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6, 52-56.
- [200] Senko, M. W., Beu, S. C., McLafferty, F. W.: Determination of Monoisotopic Masses and Ion Populations for Large Biomolecules from Resolved Isotopic Distributions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6, 229-233.
- [201] Zhang, Z., Marshall, A. G.: A Universal Algorithm for Fast and Automated Charge State Deconvolution of Electrospray Mass-to-Charge Ratio Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 225-233.
- [202] Kaur, P., O'Connor, P. B.: Algorithms for Automatic Interpretation of High Resolution Mass Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17, 459-468.
- [203] Palmblad, M.: ESIMSA. Version: 1.0, *Uppsala University, Division of Ion Physics*, <http://www.teknik.uu.se/jonfysik/depositary/esimsa.html>, **2001**.

- [204] Drader, J. J., Shi, S. D. H., Freitas, M. A., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G.: MIDAS. Version: 3.21, *National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee, USA*, <http://magnet.fsu.edu/~midas/>, **2004**.
- [205] Horn, D. M., Zubarev, R. A., McLafferty, F. W.: Automated Reduction and Interpretation of High Resolution Electrospray Mass Spectra of Large Molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11, 320-332.
- [206] Spengler, B.: De Novo Sequencing, Peptide Composition Analysis, and Composition-Based Sequencing: A New Strategy Employing Accurate Mass Determination by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 703-714.
- [207] Kammerer, B., Frickenschmidt, A., Gleiter, C. H., Laufer, S., Liebich, H.: MALDI-TOF MS Analysis of Urinary Nucleosides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 940-947.
- [208] Fonseca, T., Lopes, N. P., Gates, P. J., Staunton, J.: Fragmentation Studies on Tetronasin by Accurate-Mass Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 325-335.
- [209] Guan, F., Soma, L. S., Luo, Y., Uboh, C. E., Peterman, S.: Collision-Induced Dissociation Pathways of Anabolic Steroids by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17, 477-489.
- [210] Harvey, D. J.: Fragmentation of Negative Ions from Carbohydrates: Part 1. Use of Nitrate and Other Anionic Adducts for the Production of Negative ion Electrospray Spectra from N-linked Carbohydrates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 622-630.
- [211] Harvey, D. J.: Fragmentation of Negative ions from Carbohydrates: Part 2. Fragmentation of High-Mannose N-linked Glycans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 631-646.
- [212] Harvey, D. J.: Fragmentation of Negative Ions from Carbohydrates: Part 3. Fragmentation of Hybrid and Complex N-Linked Glycans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 647-659.
- [213] Cooks, R. G.: Collision-induced Dissociation: Readings and Commentary. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 1215-1221.
- [214] Syrstad, E. A., Turecek, F.: Toward a General Mechanism of Electron Capture Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 208-224.
- [215] Shi, S. D. H., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G., Siegel, M. M., Kong, F., Carter, G. T.: Structural Validation of Saccharomicins by High Resolution and High Mass Accuracy Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry and Infrared Multiphoton Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 1285-1290.

- [216] Little, D. P., Speir, J. P., Senko, M. W., O'Connor, P. B., McLafferty, F. W.: Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 2809-2815.
- [217] Rosenfeld, R. N., Jasinski, J. M., Braumann, J. L.: Infrared Multiphoton Dissociation of the Methanol Solvate of the Fluoride Ion, CH₃OHF. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 658-663.
- [218] Bure, C., Lange, C.: Comparison of Dissociation of Ions in an Electrospray Source, or a Collision Cell in Tandem Mass Spectrometry. *Curr. Org. Chem.*, **2003**, 7, 1613-1624.
- [219] Gauthier, J. W., Trautman, T. R., Jacobson, D. B.: Sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation involving Fourier transform mass spectrometry. Collision-activated dissociation technique that emulates infrared multiphoton dissociation. *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 246, 211-225.
- [220] McLafferty, F. W., Turecek, F.: *Interpretation von Massenspektren*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.
- [221] Storm, T.: Untersuchungen zum Stoffverhalten in Industrieabwasser und aquatischer Umwelt mit HPLC-MS. *Technische Universität Berlin*, **2002**, These/Disseration.
- [222] Wu, Q.: Multistage Accurate Mass Spectrometry: A "Basket in a Basket" Approach for Structure Elucidation and Its Application to a Compound from Combinatorial Synthesis. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 865-872.
- [223] Bozorgzadeh, M. H., Morgan, R. P., Beynon, J. H.: Application of Mass-analysed ion Kinetic Energy Spectrometry (MIKES) to the Determination of the Structures of Unknown Compounds. *Analyst*, **1978**, 103, 613-622.
- [224] Cuber, U.: *C-Programmierung: Grundlagen und fortgeschrittene Programmiertechniken*. Econ Taschenbuchverlag, Düsseldorf, München, **1998**.
- [225] Stroustrup, B.: *Die C++ Programmiersprache*. 4., und erw. Aufl. Addison-Wesley, München, **2004**.
- [226] Cuber, U.: *C++-Programmierung: Grundlagen und fortgeschrittene Programmiertechniken*. First Ed. ECON Taschenbuch Verlag, Düsseldorf und München, **1998**.
- [227] Andrews, M.: *Visual C++ jetzt!* Microsoft Press, Unterschleißheim, **1996**.
- [228] Diestel, R.: *Graph Theory*. Electronic Edition 2000, Springer Verlag, New York, **2000**.
- [229] Stoll, N., Schmidt, E., Thurow, K.: Isotope Pattern Evaluation for the Reduction of Compositons Assigned to High Resolution Mass Spectral Data from Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 1692-1699.

- [230] Kollroser, M., Schober, C.: Determination of Coumarin-type Anticogulants in Human Plasma by HPLC-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Ion Trap Detector. *Clinical Chemistry*, **2002**, 48, 84-91.
- [231] Haas, R.: Blaukreuzkampfstoffe. Chemisches Verhalten und humantoxikologische Bedeutung von Diphenylarsinverbindungen 1. Chemische Reaktionen. *Umweltmed. Forsch. Prax.*, **1996**, 1, 183-189.
- [232] Haas, R.: Blaukreuzkampfstoffe. Chemisches Verhalten und humantoxikologische Bedeutung von Diphenylarsinverbindungen 2. Humantoxikologische Bedeutung. *Umweltmed. Forsch. Prax.*, **1997**, 2, 11-16.
- [233] Pommerantz, S. C., Kowalak, J. A., McCloskey, J. A.: Determination of Oligonucleotide Composition from Mass Spectrometrically Measured Molecular Weight. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, 4, 204-209.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit über „Algorithmierung und automatisierte Datenauswertung für die hochauflösende und ultrahochauflösende Massenspektrometrie“ von mir selbstständig angefertigt wurde, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer und unter Anwendung der entsprechend gekennzeichneten Hilfsmittel und Literaturangaben.

Rostock, 31.03.2007

Lebenslauf

von:	Enrico Schmidt	
geboren am:	18. März 1978 in Rostock	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	1984-1986:	9. Polytechnische Oberschule (POS), Clara Zetkin, Rostock
	1986-1991	13. POS, Rostock
	1991-1994	Albert Schweitzer Gymnasium, Rostock
	1994-1996	Käthe Kollwitz Gymnasium, Rostock
	06/1996	Abitur
Wehrdienst:	1996-1997	Wehrdienst
Studium:	1997-2003:	Studium der Elektrotechnik an der Universität Rostock
	01/2003-07/2003	Diplomarbeit bei Prof. Dr. K. Thurow am Institut für Automatisierungstechnik (IAT) zum Thema: „Präzisionsmassenbestimmungen mit hochauflösenden und höchstauflösenden Massenspektrometern“
Abschluss:	07/2003	Diplom Ingenieur
Berufsausübung:	08/2003-12/2007	wiss. Mitarbeiter an der Universität Rostock, Institut für Automatisierungstechnik, Stipendiat des Gradiertenkollegs „Neue Methoden für Nachhaltigkeit in Katalyse und Technik“
	11/2007	Promotion „Algorithmierung und automatisierte Datenauswertung für die hochauflösende und ultrahochauflösende Massenspektrometrie“